

Jenni Koskinen, Maija Makkonen

Anaerobibakteerien antibioottiherkkyysmäärittäykset HUSLABin bakteriologian osastolla

Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljan testaus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

19.4.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Jenni Koskinen, Maija Makkonen Anaerobibakteerien antibioottiherkkyyismääritykset HUSLABin bakteriologian osastolla 39 sivua + 0 liitettä 19.4.2016
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalyttikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Mikrobiologi Eveliina Tarkka Yliopettaja Riitta Lumme
<p>Anaerobiset bakteerit aiheuttavat erilaisia infektioita, usein sellaisilla alueilla elimistössä, jotka normaalitilanteessa olisivat steriilejä. Niiden viljelyyn ja kiekkoherkkyyismääritykseen ei ole vielä olemassa standardia, vaikka jo vuodesta 1979 asti sitä on yritetty saada aikaiseksi. Anaerobisten bakteerien tutkimukset ovat haasteellisia muun muassa niiden hitaan kasvun ja vaativien kasvuolosuhteiden takia. Tällä hetkellä harkinnassa on tehdä ensimmäinen EUCAST-standardi anaerobisille bakteereille käyttäen Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljaa. Aiemmat tutkimukset osoittavat tämän maljan tarjoavan yleisesti käytössä olevaa Wilkins–Chalgren-maljaa paremmat kasvuolosuhteet eri anaerobibakteerien vaatimuksille.</p> <p>HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osasto haluaisi siirtyä käyttämään Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljaa herkkyyismäärityksissä nykyisen WC-maljan sijaan. Tällä tavalla saataisiin elatusainevalikoimaa supistettua.</p> <p>Opinnäytetyössä käytettiin tunnettuja American Type Culture Collection (ATCC) -bakteerikantoja bakteereista <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Bacteroides fragilis</i>, <i>Prevotella intermedia</i> ja <i>Propionibacterium acnes</i> sekä tutkittiin eri mikrobilääkkeiden vaikutusta niihin. Käytetyt lääkkeet olivat penisilliini, metronidatsoli, klindamysiini, doksisykliini, imipeneemi sekä amoksisilliini-klavulaanihappo. Tarkoituksena oli selvittää, kasvavatko kaikki bakteerit Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljalla sekä etsiä mahdollisia eroja bakteerien kasvussa ja antibioottien käyttäytymisessä maljoilla. Bakteereista tehtiin 0,5 MacFarlandin vahvuiset suspensiot, viljeltiin maljalle ja tehtiin samalla lääkeherkkyyismääritykset sekä kiekko menetelmää että MIC-testiä käyttäen. MIC-testi tehtiin myös vertailuna WC-maljalle. Maljoja kasvatettiin sekä anaerobikaapissa että anaerobipytyssä .</p> <p>Opinnäytetyön tulokset tukevat aiempia tutkimuksia ja niiden perusteella voidaan todeta Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljan toimivan yleisimpien anaerobibakteerien kasvu-alustana yhtä hyvin, ellei paremmin kuin Wilkins–Chalgren-malja. Kaikki tutkitut bakteerit kasvoivat Br-maljalla hyvin ja tulokset olivat samansuuntaisia keskenään. Jatkossa on mahdollista tarkentaa kiekko menetelmän estorengasrajoja bakteriologian osastolla.</p>	
Avainsanat	Anaerobibakteerit, herkkyyismääritys, Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja

Author(s) Title	Jenni Koskinen and Maija Makkonen
Number of Pages Date	39 pages + 0 appendices 19 th April 2016
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Eveliina Tarkka, Microbiologist Riitta Lumme, Principal Lecturer
<p>Many infections of the human body especially those on a normally sterile place are caused by anaerobic bacteria. There are still no standards determined for antimicrobial disc diffusion susceptibility testing of these bacteria even though the first time it was proposed was in 1979. Studying the anaerobic bacteria is challenging due to their slow growth and fastidious needs. At the time there is a study group trying to develop the first EUCAST standard of disk diffusion method for susceptibility for the anaerobic bacteria. This has been done using Brucella agar supplemented with vitamin K1 and haemin. Previous studies have shown this type of media to support the growth of different anaerobic bacteria better than widely used Wilkins-Chalgren agar.</p> <p>The subdivision of bacteriology of the department of clinical microbiology in HUSLAB was hoping to start using the Brucella agar supplemented with vitamin K1 and haemin in their antibiotic susceptibility instead of the Wilkins-Chalgren agar that they were using. This would reduce the number of used agar and media.</p> <p>The bacteria cultivated and studied in this thesis were <i>Bacteroides fragilis</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Prevotella intermedia</i> and <i>Propionibacterium acnes</i>. The strains used were from American Type Culture Collection (ATCC). The susceptibility was done by using six different antimicrobial drugs. These were penicillin, metronidazole, clindamycin, doxycycline, imipenem and amoxicillin with clavulanic acid. The purpose of the study was to determine whether the bacteria grows on the Brucella agar and also find out the zone diameters of disc diffusion susceptibility. 0,5 MacFarland suspensions were measured and then susceptibility was done by using both disc diffusion and MIC methods on Brucella agar. As comparison the MICs were determined also to the Wilkins-Chalgren agar. The media were cultivated both in anaerobic chamber and jars.</p> <p>The gathered results second the previous studies and are enough to state that the Brucella agar supports the growth of the most common anaerobic bacteria as well if not better than Wilkins-Chalgren agar. All studied bacteria grew on the Br agar and the results were similar with each other. If wanted these results can be used in the subdivision of bacteriology to determine the zone diameter breakpoints of disc diffusion susceptibility.</p>	
Keywords	Anaerobic bacteria, susceptibility, Brucella + K1-vitamin + haemin

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Anaerobibakteerit ja niiden viljely	2
2.1	Anaerobisten bakteereiden viljely	2
2.1.1	Anaerobipytty	3
2.1.2	Anaerobikaappi	3
2.2	Bakteriologian osaston anaerobien kasvatuksessa käytettävät atmosfäärit	4
2.3	Testaukseen käytetyt bakteerit	5
2.3.1	<i>Clostridium perfringens</i>	5
2.3.2	<i>Bacteroides fragilis</i>	6
2.3.3	<i>Prevotella intermedia</i> ja <i>Propionibacterium acnes</i>	6
3	Antibioottiherkkyysmääritykset	7
3.1	Herkkyysluokat	7
3.2	Kiekkomenetelmä	8
3.3	MIC-testi	9
3.4	Testaukseen käytetyt antibiootit	9
3.4.1	Penisilliini	9
3.4.2	Metronidatsoli	10
3.4.3	Klindamysiini	11
3.4.4	Doksisykliini	12
3.4.5	Imipeneemi	12
3.4.6	Amoksisilliini-klavulaanihappo	13
3.5	Testaukseen käytetyt elatusmaljat	14
3.5.1	Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja	14
3.5.2	Wilkins–Chalgren-malja	14
3.6	Aiempaa tutkimustietoa anaerobibakteereiden herkkyysmäärityksistä	15
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat	16
5	Toteutus	17
5.1	Testatut bakteerit ja antibiootit	18
5.2	Käytännön toteutus ja siihen käytetyt välineet	19
6	Tulokset	22
6.1	<i>Bacteroides fragilis</i>	22

6.2	<i>Clostridium perfringens</i>	24
6.3	<i>Prevotella intermedia</i>	26
6.4	<i>Propionibacterium acnes</i>	28
7	Tulosten tarkastelu	30
8	Luotettavuus ja eettisyys	32
9	Pohdinta	34
	Lähteet	36

1 Johdanto

Anaerobiset bakteerit aiheuttavat erilaisia infektoita, usein sellaisilla alueilla elimistössä jotka normaalitilanteessa olisivat steriilejä; esimerkiksi leikkauksen jälkeen tai sen aikana erilaiset bakteerit voivat siirtyä niille epänormaaliin paikkaan ja aiheuttaa tulehduksen. Usein anaerobisen bakteerin aiheuttamat infektiot iskevät siis jo muutenkin vastustuskyvyltään heikompiin ihmisiin. Niinpä näiden bakteerien diagnostiikka ja myös antibioottilherkkyyden määrittäminen vaikuttaa potilaan hoitoon ja oikean lääkityksen valintaan.

Antibioottilherkkyyismääritykset aerobibakteereille tehdään Suomessa EUCAST-standardin mukaisesti. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing eli EUCAST on luonut herkkyyismäärityksille yhtenäisen standardin jota käytetään laajasti Euroopassa. Näin tulokset ovat vertailukelpoisia laaja-alaisesti.

Sen sijaan anaerobibakteereiden herkkyyismäärityksiin kiekkomenetelmää käyttäen ei vielä ole olemassa standardeja. HUSLABin bakteriologian osastolla on tähän asti näitä herkkyyismäärityksiä tehty käyttäen Wilkins–Chalgren-maljaa. Nyt tämä WC-malja on tarkoitus mahdollisesti poistaa maljavalikoimasta ja siirtyä käyttämään Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljaa, josta on tarkoitus myös mahdollisesti tehdä ensimmäiset EUCAST-standardit anaerobibakteerien herkkyyismäärityksiin (Nagy ym. 2014). Aiemmat tutkimustulokset tukevat Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljan käyttöä, sillä on todettu, että Brucella +K1-vitamiini + hemiini -maljalla kasvavat myös monet sellaiset bakteerit, jotka WC-maljalla kasvavat huonosti tai eivät ollenkaan. Lisäksi tutkimuksessa ei todettu suurimman osan bakteereista kohdalla merkittävää eroa MIC-määrityksissä. (Roe ym. 2002.) Tästä testattavasta Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljasta käytetään tekstissä jatkossa lyhennettä Br-malja ja Wilkins–Chalgren-maljaan viitataan WC-maljana.

Anaerobibakteereiden antibioottilherkkyyismääritykseen liittyvä työ tehtiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueeseen kuuluvassa bakteriologian laboratoriossa, jossa koettiin tarvetta mahdollisesti muuttaa nykyisiä toimintamalleja näissä herkkyyismäärityksissä ja tehdä testausta sitä varten. Suuri osa HUSLABin alueen bakteriologian tutkimuksista on keskitettynä Meilahteen bakteriologian osastolle, ja siellä tehdään kaikki anaerobibakteerien viljelyt.

Bakteerit ja antibiootit, mitä testauksessa käytettiin, valitsivat HUSLABin bakteriologian osaston mikrobiologi Eveliina Tarkka sekä kliininen asiantuntija Risto Hilla. Käytetyt anaerobibakteerit ovat yleisiä ja kliinisesti merkittäviä anaerobibakteereja ja näin ollen hyviä esimerkkejä elatusmaljan toimivuudesta herkkyysmäärittelyyn. Myös testauksessa käytetyt antibiootit ovat yleisiä ja lisäksi oli mahdollista jo etukäteen olettaa millaisia vaikutuksia niillä tulisi olla tutkittaviin bakteereihin.

2 Anaerobibakteerit ja niiden viljely

Bakteerit voidaan luokitella sen mukaan, tarvitsevatko ne kasvaakseen happipitoisen ympäristön vai eivät. Aerobibakteerit voidaan jakaa obligatorisiin eli ehdottomiin, fakultatiivisiin eli ehdollisiin ja mikroaerofiilisiin bakteereihin. Tämä tarkoittaa sitä, että obligatoriset bakteerit vaativat aina kasvaakseen happea, kun taas esimerkiksi tunnettu bakteeri *E.coli* voi kasvaa sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa, ja on siis siten fakultatiivisesti aerobi bakteeri. Mikroaerofiiliset bakteerit tarvitsevat kasvaakseen happea, mutta niille riittää vähempi happipitoisuus kun maapallomme ilmakehässä on. (Hoffman 2002: 1–3.)

Varsinaiset anaerobibakteeritkin voidaan jakaa kahteen luokkaan: ehdottomiin anaerobeihin sekä aerotolerantteihin anaerobeihin. Ehdottomat anaerobit vaativat ehdottomasti hapettoman ympäristön, ja ne kuolevat herkästi happipitoisessa ympäristössä. Aerotolerantit bakteerit sen sijaan sietävät jonkin verran happea, mutta eivät kuitenkaan käytä sitä kasvaessaan ollenkaan. (Hoffman 2002: 1–3.)

Anaerobiset bakteerit kuuluvat monesti synnynnäisesti ihmisen normaaliflooraan. Niitä löytyy monilta alueilta kymmen- tai jopa satakertaisesti enemmän kuin aerobibakteereita. Monet näistä anaerobibakteereista ovat lisäksi opportunistisia patogeenejä, eli immuunipuolustuksen ollessa niiden elinalueella alhainen, ne lisääntyvät ja leviävät paikallisiin kudoksiin aiheuttaen näin tauteja. (Hoffman 2002: 1–3.)

2.1 Anaerobisten bakteereiden viljely

Anaerobibakteereita viljeltäessä tulee muistaa, että bakteerit ovat herkkiä ja kuolevat helposti joutuessaan tekemisiin ilmakehän hapen kanssa. Niinpä oikeat työtavat ja ri-

peä työskentely ovat avainasemassa, kun käsitellään anaerobibakteereja laboratorioolosuhteissa. Anaerobisten bakteerien kasvattamiseen on olemassa erilaisia menetelmiä. Myös HUSLABin bakteriologian osastolla käytetään kahdenlaisia viljelyympäristöjä. Käytössä on niin sanottuja anaerobipyttyjä sekä anaerobikaappi.

2.1.1 Anaerobipytty

Anaerobibakteereja voidaan kasvattaa astiassa, johon luodaan anaerobiset olosuhteet. Tavallisesti astiasta poistetaan happi, ja laitetaan tilalle vety- tai typpikaasua sekä hiilidioksidia. Ensin astiaan siis imetään tyhjiö, jonka jälkeen se täytetään kaasulla. (Montonen – Salkinoja-Salonen 2001: 66.)

Vaihtoehtoisesti pyttyyn luodaan oikeanlaiset olosuhteet reagenssien avulla. Tällöin astiaan laitetaan kaasukehitinpusseja, jotka yhdessä reagoidessaan tuottavat kaasua ja saavat aikaan hapettomat olosuhteet. Bakteriologian osastolla anaerobioosi luodaan pyttyihin nimenomaan kaasukehitinpussien avulla. Myös askorbiinihapon hapettumiseen perustuvia hapenpoistopusseja voidaan käyttää anaerobioosin luomiseen. (Montonen – Salkinoja-Salonen 2001: 66.)

Astian hapettomuutta voidaan seurata läpinäkyvän astian läpi kaupallisten hapetuspelkistys-indikaattorien avulla ilman että astiaa tarvitsee avata. Indikaattorin värinmuutokset kertovat, ovatko olosuhteet oikeat. (Montonen – Salkinoja-Salonen 2001: 66.)

2.1.2 Anaerobikaappi

Erityisen happiherkät lajit viljellään anaerobikaapissa. Siellä on kokoajan hapettomat olosuhteet. Kaappi on siis täytetty kaasulla ja siellä on lievä ylipaine, jottei happea pääse kaappiin. Vaativien anaerobien viljely on helppo tehdä anaerobikaapissa, sillä siellä niitä voi käsitellä kuten tavallisia aerobisia bakteereja laboratoriossa. (Montonen – Salkinoja-Salonen 2001: 67.)

Anaerobikaapit ovat kaupallisesti valmistettuja. Kaapin läpinäkyvässä etuseinässä on aukot, joihin on kiinnitettynä käsiineet tai hihat. Näiden aukkojen kautta työskentely onnistuu niin, ettei se vaikuta olosuhteisiin sisällä kaapissa. (Montonen – Salkinoja-Salonen 2001: 68.)

2.2 Bakteriologian osaston anaerobien kasvatuksessa käytettävät atmosfäärit

Anaerobibakteereja kasvatetaan bakteriologian osastolla kahdella eri tavalla: joko anaerobikaapissa tai anaerobipytyssä, joka on astia mihin luodaan bakteereille suotuisat hapettomat olosuhteet. Anaerobipytyä pidetään lämpöhuoneessa kasvatuksen ajan, anaerobikaapissa taas on sekä oikea lämpötila että hapettomat olosuhteet jatkuvasti. Pääasiassa jako menee niin, että veriviljelyitä kasvatetaan anaerobikaapissa ja märkäviljelynäytteet anaerobipytyissä.

Bakteriologian osaston anaerobikaapissa on yhdistelmä erilaisia kaasuja, joilla luodaan hapettomat ja anaerobibakteereille otolliset olosuhteet. Kyseinen kaappi; Don Whitley Scientific:in Whitley MG500, käyttää hiilidioksidia, vetyä sekä typpeä. Jokaisella näistä kaasuista on oma säiliönsä, jonka täyttöastetta ja painetta tarkkaillaan päivittäin. Toiseen käytettyyn kasvatustapaan eli anaerobipytyyn oikeat olosuhteet luodaan BD:n valmistamalla GasPak EZ Anaerobe Container System -pussilla. Tämä kaasukehitinpussi aktivoituu joutuessaan ilman kanssa kosketuksiin ja luo pieneen tilaan anaerobiset olosuhteet alentamalla hapen määrää.



Kuvio 1. Bakteriologian osaston anaerobikaappi.

2.3 Testaukseen käytetyt bakteerit

Työssä käytettiin sairaalamikrobiologi Eveliina Tarkan ja klinisen asiantuntija Risto Hillan valitsemaa neljää yleistä ja kliinisesti merkittävää anaerobibakteeria. Ne ovat kaikki hieman erilaisia vaatimiltaan kasvuolosuhteilta, joten ne antavat hyvin tietoa siitä, miten erilaiset bakteerit sopivat kasvatettavaksi samalla maljalla.

2.3.1 *Clostridium perfringens*

Klostridit ovat grampositiiviseksi värjäytyviä, suurikokoisia itiöllisiä sauvabakteereja (Jousimies-Somer – Ristola 2003: 228). *Clostridium perfringens* on hyvin yleinen ruokamyrkytysten aiheuttaja Suomessa. Bakteeri kasvaa hapettomissa oloissa, mutta siedää hyvin ravinnon puutetta, kuivuutta ja kuumuutta. Tyypillisesti tartunta välittyy ihmiseen esimerkiksi huonosti kypsennetyistä lihatuotteista, mutta tartunta ei ole mahdoton myöskään kuivat tuotteiden välityksellä vaikkapa mausteista. (Evira 2013.)

Ruokamyrkytysoireet, useimmiten kouristukselliset vatsakivut, johtuvat siitä että tautia aiheuttava bakteeri tuottaa enterotoksiinia. Normaalisti toipuminen tapahtuu muutamassa päivässä, joskin esimerkiksi laitoshoidossa oleville vanhuksille bakteerin tuottama enterotoksiini voi aiheuttaa pitkittyneen ripulin. (Jousimies-Somer – Ristola 2003: 233.)

Lisäksi *Clostridium perfringens* kuuluu niihin bakteereihin, jotka saattavat aiheuttaa vaarallista kaasukuoliota. Esimerkiksi syvässä haavainfektiossa vaurioituneeseen kudokseen voi kertyä liukenematonta tyypeä ja vetyä bakteerien kasvun ja siten niiden energiantuotannon seurauksena. Nämä jäävät kudokseen kaasukuplina, ja syntyy paikallinen kivulias turvotus joka laajenee hyvin nopeasti. Toksiineja imeytyy infektiol alueelta myös vereen aiheuttaen yleisen toksemian ja vakavia yleisoireita. Tauti etenee hyvin nopeasti ja voi johtaa kuolemaan. Hoitona tärkeää on infektoituneen alueen nopea kirurginen poisto, eli esimerkiksi raajan amputaatio. Mikrobilääkityksenä käytetään ensisijaisesti klindamysiiniä ja G-penisilliiniä yhdessä. (Jousimies-Somer – Ristola 2003: 232–233.)

2.3.2 *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis on erittäin virulentti anaerobinen bakteeri, jota löytyy paljon ihmisen suoliston limakalvoilta. Bakterin tärkeä virulenssitekijä on sen polysakkaridikapseli (Jousimies-Somer – Vuento 2003: 241). Bakteeri pystyy hyvin kiinnittymään erilaisiin kudoksiin ja onkin yleinen löydös. Se erittää entsyymejä, jotka vaikuttavat sappihappojen konjugoitumiseen ja tämä edelleen vaikuttaa mm. kolesteroliarvoihin. Bakterilla on myös keinoja puolustautua ihmisen immuunivastetta vastaan. Lisäksi se saattaa muodostaa paiseita ja tuhota kudosta. (Rautio – Vuento 2010.)

Bacteroides fragilis on gramnegatiivinen sauvabakteeri. Usein nämä anaerobit, gramnegatiiviset sauvat eivät aiheuta infektioita jollei niiden isännän puolustuskyky ole jollain tapaa alentunut. Lisäksi ne tarvitsevat usein muiden bakteerien apua ja saattavat siten vaikeuttaa muuta taudinkuvaa aikaansaamalla niille ominaisen paiseen. (Jousimies-Somer – Vuento 2003: 241.)

B. fragilis -ryhmän bakteerit ovat usein tuottamiensa beetalaktamaasien vuoksi resistenttejä kefalosporiineille ja penisilliineille (Jousimies-Somer – Vuento 2003: 244).

2.3.3 *Prevotella intermedia* ja *Propionibacterium acnes*

Prevotella intermedia on anaerobinen bakteeri, jota löytyy suusta; hammasplakista. Se aiheuttaa vaikeaa ientulehdusta, erityisesti hampaan vieruskudoksessa, joka yhdistää hampaan leukaluuhun. (Meurman – Richardson – Kinnunen 2011.)

Propionibacterium acnes on ihon normaaliflooraan kuuluva grampositiivinen sauvabakteeri. Se voi joskus löytyä veriviljelystä, mutta sitä pidetään yleensä iholta tulleenä kontaminanttina. Pääosin *P. acnes* aiheuttaa talirauhasen tulehduksia sekä aknen leesioita. Se tuottaa lipaasientsyymiä, joka hajottaa talia ja tästä syntyvät hajoamistuotteet aiheuttavat aknen. (Rautio 2010.)

3 Antibioottiherkkyysmääritykset

Oikean lääkehoidon valinta ilman herkkyysmäärityksen tulosta voi olla hankalaa, joten lääkeherkkyysmääritys on potilaan hoidon kannalta tärkeä ja oleellinen tutkimus. Suomessa antibioottiherkkyysmääritykset aerobibakteereille tehdään EUCAST-standardin mukaisesti. EUCAST, eli European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, on vuonna 1997 perustettu komitea jonka tavoitteena on ollut antibioottiherkkyysmääritysten standardointi ja menetelmien yhtenäistäminen Euroopassa. (EUCAST.)

Bakteerien lääkeherkkyys riippuu sen elinympäristöstä elimistössä, bakteerien määrästä ja kasvunopeudesta. Tarvittavat pitoisuudet tulee siksi määrittää kliinisin laboratorio-oikein ja annosteltava lääkemäärä tulee olla 2–4 kertaa suurempi kuin laboratorioolosuhteissa saatu pienin estopitoisuus tutkittavalle bakteerille. Bakteerien herkkyiden ja mikrobilääkkeen tehon mittana käytetään MIC-arvoa (Minimal Inhibitory Concentration), eli pienintä lääkkeen pitoisuutta, jolla bakteerin kasvu saadaan estettyä laboratorioolosuhteissa. MIC-arvo ilmoitetaan $\mu\text{g/ml}$ ja yleisimmin lääkkeiden arvot ovat luokkaa 0,01–10 $\mu\text{g/ml}$. MIC-arvon lisäksi voidaan myös tarvittaessa määrittää MBC-arvo, eli pienin bakteerin tappava konsentraatio (engl. Minimal Bactericidal Concentration). (Vaara – Huovinen 1997g: 349–350.)

Bakteerilajeilla on tehty populaatiotutkimuksia, joiden pohjalta on voitu määrittää keskimääräiset herkkyudet bakteerilääkkeille. Lisäksi, kun tiedetään millaisia kudospitoisuuksia kullakin bakteerilääkkeellä on mahdollista saavuttaa, on voitu muodostaa kliinistä käyttöä varten herkkyysluokat bakteerilajeille ja -lääkkeille. Bakteeria tutkiessa voidaan näin verrata patogeenisten bakteerien herkkyksiä samalle lajille tai bakteeriryhmälle määritettyihin herkkyystulkintarajoihin. (Vaara – Huovinen 1997g: 349–350; Tarkka 2015b.)

3.1 Herkkyysluokat

Käytössä on tällä hetkellä kansainvälisesti yhteneväinen herkkyysluokitus, SIR-järjestelmä. Siinä on kolme erilaista herkkyysluokkaa. Nämä ovat S (= susceptible), I (= intermediate/interminate) sekä R (= resistant). S-luokituksessa bakteeri on herkkä kyseiselle bakteerilääkkeelle ja tämä lääke soveltuu käytettäväksi infektioiden hoitoon sen normaaliannoksina. I-luokituksessa bakteerin herkkyys on vähentynyt tai vaihtoehtoisesti sitä ei voida täysin varmentaa. Nämä lääkkeet sopivat suurina annoksina an-

nettavaksi yleisinfektion hoitoon, normaaliannoksena virtsatieinfektion hoitoon, mikäli lääkeaine konsentroituu virtsaan aktiivisena sekä paikallishoitoon. Viimeisessä luokassa, eli luokassa R, lääke ei tehoa bakteeriin, joten lääke ei sovellu infektion hoitoon. Joistakin lääkkeistä ei käytetä luokitusta I ollenkaan. (Vaara – Huovinen 1997g: 349–350.)

Lääkeherkkyysmäärittämiä voidaan tehdä MIC-testillä, kiekko- ja laimennusmenetelmällä sekä entsyymi- ja geenimäärittämisillä. Näistä kahta ensimmäistä käytetään tässä opinnäytetyössä. (Vaara – Huovinen 1997g: 349–350.)

3.2 Kiekkomenetelmä

Kliinisten näytteiden patogeenisten bakteerien lääkeherkkyys voidaan määrittää kiekkomenetelmällä. Sitä käytetään erityisesti nopeasti kasvavien bakteerien kohdalla. Tässä menetelmässä bakteerisuspensiota levitetään tasaisesti maljalle ja siihen asetetaan yksi tai useampi lääkekiekko tai -tabletti. EUCAST-standardissa määritellään esimerkiksi käytettävän bakteerisuspension vahvuus, käytettävät herkkyysmaljat ja se, miten estorengas mitataan (EUCAST 2015). Kiekot ja tabletit sisältävät vakiomäärän tiettyä mikrobilääkettä ja sen vaikutus viljeltyyn bakteeriin on verrannollinen estorengkaan suuruuteen. Mikäli lääke tehoaa kyseiseen bakteeriin, se ei pysty kasvamaan kiekon läheisyydessä, sillä kiekosta diffundoituu bakteerilääkettä maljalle estäen bakteerikasvua. Tätä aluetta kiekon ympärillä, missä bakteeri ei kasva, kutsutaan estorengaksi. Mitä suurempi estorengas on, sitä paremmin lääke yleensä tuhoaa näitä bakteereja myös elimistössä. Tulokset ilmoitetaan tämän perusteella SIR-järjestelmän mukaisesti. (Vaara – Huovinen 1997g: 349–350.)

Aerobibakteereille herkkyysmäärittästä tehdessä toimitaan siis Suomessa ja laajalti Euroopassakin EUCAST-standardin mukaan. EUCAST on määritellyt tarkasti esimerkiksi sen, miten herkkyysmäärittämiin käytettäviä Müller–Hinton-maljoja tulee säilyttää ja kuinka bakteerisuspensio levitetään eli dreijataan maljalle. Myös antibiootikiekkojen lisääminen, maljojen inkubaatioajat ja -lämpötilat sekä estorengaiden mittaaminen on ohjeistettuna standardiin. Kun määrittäminen suoritetaan näiden ohjeiden mukaan, se on luotettava ja vertailukelpoinen myös muualla tehtyjen määrittäysten kanssa. (EUCAST 2015.)

3.3 MIC-testi

MIC-testi (Minimal Inhibitory Concentration), josta yleisimmin käytössä oleva versio tunnetaan myös E-testinä (Epsilon-testi), toimii samalla tavalla kuin antibioottikiekot, mutta se antaa tarkemman tiedon siitä, millainen annostus kyseistä antibioottia toimii tuhoamaan bakteerikannan. Tässä bakteerisuspension levityksen jälkeen elatusmaljalle asetetaan liuska, jonka alapuolella on lääkegradientti. Sen pinnalla on lääkepitoisuusasteikko (mg/l), jonka avulla tulokset luetaan; siitä kohdasta mihin bakteerikasvu loppuu, nähdään pienin bakteerin kasvun estävä lääkepitoisuus. MIC-testi antaa siis tarkemman määrittystuloksen. (Biomerieux 2015.) MIC-testi voidaan kuitenkin tehdä myös käyttämällä joko malja- tai liemilaimennosmenetelmää (Tarkka 2015a).

3.4 Testaukseen käytetyt antibiootit

Työssä käytettävät antibiootit valikoituivat HUSLABin mikrobiologian osastolla työskentelevien Risto Hillan ja Eveliina Tarkan toiveesta. Ne ovat anaeroobeille yleisesti käytettäviä mikrobilääkkeitä ja niiden oletettava vaikutus tutkimuksessa käytettäviin bakteereihin on valmiiksi tiedossa, mikä helpottaa esimerkiksi tulosten luotettavuuden tulkinassa.

3.4.1 Penisilliini

Penisilliini on vanhimpia tunnettuja antibiootteja. Ensimmäiset niistä on saatu eristämällä *Penicillium*-suvun sienistä *P. notatum* ja *P. chrysogenum*. Tällaisia luonnollisia penisilliinejä ovat G-penisilliini (bentsyylipenisilliini) ja V-penisilliini (fenoksimetyylipenisilliini). Niiden lisäksi on myös valmistettu lukuisia puolisynteettisiä penisilliinejä muutamalla sienien rakennetta. Molemmat luonnolliset penisilliinit sekä kaikki niiden johdannaiset ovat beetalaktaameja. Tämä tarkoittaa, että ne sisältävät rakenteen, joka muistuttaa peptidoglykaanin perusyksikön pentapeptidin D-alanyyli-D-alaniini-osaa. Tämä on keskeinen substraatti monille entsyymeille. Siksi beetalaktaamit pystyvät sitoutumaan tällaisiin entsyymeihin bakteerissa samalla tavalla kuin substraatti ja näin inhiboimaan tai muokkaamaan niiden toimintaa. (Vaara – Huovinen 1997: 354–357.)

Monet grampositiiviset, kuten esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae*, anaerobiset grampositiiviset kokit ja kaikki beetahemolyyttiset streptokokit, sekä myös jotkin gram-negatiiviset bakteerit, kuten osa anaerobisista sauvoista ovat herkkiä G-penisilliinille. Monet bakteerit, eritoten gramnegatiiviset sauvat, ovat kuitenkin luonnostaan resistenttejä tälle niiden soluseinän ulkomembraanin rakenteen takia, jonka läpi luonnollisten penisilliinien on vaikea tunkeutua. Tällaisia ovat esimerkiksi *Bacteroides fragilis* -ryhmän bakteerit, jotka ovat kliinisesti yleisin löydös anaerobiviljelyssä. Lisäksi monilla bakteereilla on myös luonnostaan beetalaktaameja tuhoavia aineita; kromosomaalisia beetalaktamaaseja. V-penisilliini on yleensä vähemmän tehokas kuin G-penisilliini. Kuitenkin monet bakteerikannat ovat alkaneet kehittämään resistenssiä penisilliinejä kohtaan. Tätä niin sanottua ”ei luonnollista” resistenssiä sanotaan hankituksi resistenssiksi. (Vaara – Huovinen 1997: 354–357; Tarkka 2015b.)

Ensimmäinen luonnollisista penisilliineistä johdettu lääke oli metisilliini. Muita puolisynteettisiä penisilliinejä ovat kloksasilliini, dikloksasilliini, nafsilliini, oksasilliini, ampisilliini, pivampisilliini, bakampisilliini, amoksisilliini, piperasilliini sekä mesillinaami. Nämä toimivat paremmin myös luonnostaan penisilliinille resistenttejä kantoja kohtaan. (Vaara – Huovinen 1997: 354–357.)

G-penisilliini ei ole kovin happoresistentti, vaan hajoaa helposti matalassa pH:ssa. Tämän johdosta se hajoaa mahalaukussa, eikä sovellu suun kautta annosteltavaksi. Sitä käytetäänkin parenteraalisesti, eli ohjataan ruiskulla suoraan kudoksiin tai verenkiertoon. Sen sijaan V-penisilliini kestää hyvin happoja ja soveltuu suun kautta annettavaksi. (Vaara – Huovinen 1997: 354–357.)

3.4.2 Metronidatsoli

Metronidatsoli on nitroimidatsolisuvun antibiooteista vanhin ja eniten käytössä oleva lääkeaine. Aluksi sitä käytettiin vain alkueläinten aiheuttamiin infektioihin, kunnes sen teho anaerobibakteereihin havaittiin. (Vaara – Huovinen 1997b: 386–387.)

Metronidatsoli on bakteerimutageeni. Sen lisäksi sen teho perustuu kykyyn vaurioittaa nukleiinihappoja. Tämä tapahtuu, kun anaerobibakteerit pelkistävät nitroimidatsolia. Lääkettä on käytetty vuosikymmeniä ilman suurempia haittavaikutuksia, mutta suuremmilla annostuksilla on todettu eläinkokeissa karsinogeenisia vaikutuksia. Muut haittavaikutukset ovat yleensä harvinaisia sekä melko lieviä. Näihin kuuluu pahoinvointi,

vatsakivut sekä kielen tahmeus. Pitkäaikainen hoito tai suuret annokset saattavat kuitenkin altistaa leukosytopenialle tai joillekin neurologisille oireille; kirvely, kutina, raajojen puutuminen ja kouristustaipumukseen omaavilla kohtauksiin. Lisäksi alkoholin kanssa käytettynä sillä on antabusreaktion aiheuttava vaikutus. (Vaara – Huovinen 1997b: 386–387.)

Metronidatsoli on hyvin imeytyvä suun kautta sekä peräpuikkona annosteltua. Se tunkeutuu hyvin kudoksiin, likvoriin, verenkiertoon sekä absesseihin ja erittyy aktiivisena virtsaan, vaikka maksa suodattaakin osan. Lääkkeestä on olemassa myös suonensisäisesti annosteltavia muotoja, mutta suun kautta annettaessakin voidaan saada seerumipitoisuus jopa sepsishoitoon riittävälle tasolle. (Vaara – Huovinen 1997b: 386–387.)

3.4.3 Klindamysiini

Klindamysiini saadaan *Streptomyces lincolnensis* -sienen tuottamasta linkomysiinistä. Se on bakteeristaattinen antibiootti, joka toimii proteiinisynteesin estäjänä. Se sitoutuu bakteeriribosomin 50S-kappaleeseen. Tähän samaan ribosomin kohtaan sitoutuu myös erytromysiini ja siksi sillä ja klindamysiinillä on havaittu yhdessä antagonistinen vaikutus sekä ristiresistenssiä. (Vaara – Huovinen 1997c: 374–375.)

Klindamysiini tehoaa suuren osaan grampositiivisista bakteereista, mutta monet gramnegatiiviset bakteerit taas ovat sille resistenttejä, lukuun ottamatta joitain anaerobisia gramnegatiivisia sauvoja (Vaara – Huovinen 1997c: 374–375).

Lääkettä voidaan käyttää joko suun kautta annosteltuna tai parenteraalisesti. Molemmilla käyttötavoilla se tunkeutuu hyvin kudoksiin ja luustoon, mutta likvoriin se ei juurikaan pääse. Se hajoaa pitkälti maksassa, eikä erity virtsaan aktiivisena, mutta saattaa silti aiheuttaa komplikaatioita munuaisinsuffisienssipotilailla. Vakavia haittavaikutuksia on harvoin. Yleisin sivuvaikutus klindamysiinillä on ripuli, joka voi joskus olla vaikeakin. Samoin useasti todetaan seerumin maksaentsyymipitoisuuden kasvua, mutta varsinaisia maksaoireita ilmenee harvoin. Pahimmillaan (joskin hyvin harvoin) lääke aiheuttaa pseudomembranoottista enterokoliittia, mikä on vakava suolistotulehdus. (Vaara – Huovinen 1997c: 374–375.)

3.4.4 Doksisykliini

Doksisykliini on tetrasykliini-ryhmän mikrobilääke. Tetrasykliinit estävät prokaryoottien proteiinisynteesiä ja ne saadaan eristämällä *Streptomyces*-sienien kannoista. Luonnostaan lähestulkoon kaikki bakteerit ovat niille herkkiä, mutta laaja käyttö on aiheuttanut joidenkin resistenttien muotojen muodostumiseen. Resistenssi on yleensä R-tekijävälitteinen. On myös joitakin luonnostaan resistenttejä lajeja, kuten *Proteus mirabilis* ja useat *Bacteroides fragilis* -kannat. (Vaara – Huovinen 1997d: 375–376.)

Doksisykliini imeytyy nopeasti, mutta erittyy hitaasti, eikä sitä siksi tarvitse annostella kuin kerran vuorokaudessa. Lisäksi se tunkeutuu hyvin kudoksiin ja likvoriin. Se ei kuitenkaan imeydy munuaisten kautta enää elimistöön vaan imeytyminen tapahtuu ruoansulatuksen kautta. Siksi sitä voidaan käyttää myös munuaisen vajaatoiminnasta kärsivillä potilailla. Doksisykliinin yleisin käyttötapa on suun kautta annosteltava lääke, mutta siitä on myös parenteraaliseen käyttöön soveltuva versio. (Vaara – Huovinen 1997d: 375–376.)

Muiden tetrasykliinien tavoin doksisykliini konsentroituu kasvavaan luukudokseen, kuten hampaisiin ja värjää sitä keltaiseksi samalla heikentäen kudosta. Lisäksi doksisykliini saattaa vaikuttaa ihon fotosensitisaatioon sekä ärsyttää vatsan limakalvoja ja voi siksi aiheuttaa oksentelua sekä pahoinvointia. Harvinaisempia sivuvaikutuksia tetrasykliineillä on hyvänlaatuinen ja ohimenevä aivopaineen kasvu. (Vaara – Huovinen 1997d: 375–376.)

Doksisykliinin pääasiallinen käyttö kohdistuu ylähengitystieinfektioiden hoitoon sekä klamydian ja mykoplasmojen aiheuttamiin tauteihin. Muita käyttökohteita lääkkeellä on Lymen taudin varhaisasteiden ja aknen hoito. (Vaara – Huovinen 1997d: 375–376.)

3.4.5 Imipeneemi

Imipeneemi on beetalaktaamiryhmän mikrobilääke, joka muistuttaa rakenteeltaan penisilliinejä. *Streptomyces cattleyan* -sieni muodostaa tienamysiiniä ja siitä syntetisoituja muotoja kutsutaan karbapeneemeiksi. Näistä yksi on imipeneemi. Sillä on laajempi antibakteerinen spektri kuin millään toisella beetalaktaamiryhmän antibiootilla, eikä suurimalla osalla kromosomaalisista tai R-faktorien koodaamista beetalaktamaaseista tehoa siihen. (Vaara – Huovinen 1997e: 368–369.)

Luontaisesti resistenttejä bakteerilajeja ei ole montaa, mutta hankittua resistenssiä löytyy joistain bakteerilajista. Tällöin yleensä bakteeri ulkomembraanin permeabiliteetissa tai PBP-proteiinissa tapahtuu muutos, joka estää imipeneemiä tehoamasta. Ne saattavat myös alkaa tuottaa imipeneemiä hajottavia entsyymejä. Imipeneemiä ei käytetä suun kautta annosteltavana, vaan ainoastaan parenteraalisesti. (Vaara – Huovinen 1997e: 368–369.)

Vaikka imipeneemillä on laaja spektri bakteereja, joita vastaan sitä voisi käyttää, sen pääasiallinen käyttö on vaikeat ja komplisoituneet infektiot sairaalahoidossa. Tällä pyritään vähentämään resistenttien kantojen muodostumista ja sen aiheuttamien hiiwasuperinfektioiden puhkeamista. (Vaara – Huovinen 1997e: 368–369.)

3.4.6 Amoksisilliini-klavulaanihappo

Amoksisilliini on sukua penisilliineille ja se hajottaa bakteereita samalla tavalla. Klavulaanihappo on *Streptomyces clavuligerus* -bakteerin tuottama entsyymi-inhibiittori, jolla yksinään on hyvin heikko antibakteerinen vaikutus. Se kuitenkin estää plasmidiperäisten beetalaktamaasien toimintaa ja näin edesauttaa amoksisilliinin vaikutusta. Näiden kahden aineen yhdistelmää on käytetty jo pitkään lääkkeenä. Se tehoaa erityisen hyvin mm. bakteereihin *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides fragilis* ja *Escherichia coli* sekä *Klebsiella*-kantoihin. (Vaara – Huovinen 1997f: 359–360.)

Amoksisilliini on happoresistentti lääke ja siksi imeytyy erittäin hyvin suun kautta otettuna. Sen imeytymisprosentti on 75–90 %. Se tunkeutuu tehokkaasti myös kudoksiin ja eritteisiin. Amoksisilliinin tavoin klavulaanihappo imeytyy hyvin suun kautta annosteltuna ja se myös erittyy aktiivisessa muodossa virtsaan. (Vaara – Huovinen 1997f: 359–360.)

Amoksisilliini tehoaa samoihin grampositiivisiin bakteereihin kuin penisilliinitkin, tosin toisiin hieman heikommin ja taas enterokokkeihin niitä paremmin. Koska se on kuitenkin johdettu penisilliinistä, on sekin samalla tavalla herkkä beetalaktamaasille ja näin sillekin on monia resistenttejä kantoja. Yhdistettynä klavulaanihappoon amoksisilliini pystyy kuitenkin vaikuttamaan penisilliiniä paremmin bakteereihin. Haittana amoksisil-

liini-klavulaanihappo-antibiootilla on jotkin gastrointestiaaliset sivuvaikutukset, kuten ripuli. (Vaara – Huovinen 1997f: 359–360.)

3.5 Testaukseen käytetyt elatusmaljat

Testauksessa käytettiin Brucella + K1-vitamiini + hemiini- sekä Wilkins–Chalgren -maljoja, ja tarkoituksena oli testata ja Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljaa, jotta se olisi mahdollista ottaa käyttöön herkkyysmäärityksissä myöhemmin. Testattavat maljat valikoituivat mukaan Bakteriologian asiantuntijoiden toiveesta.

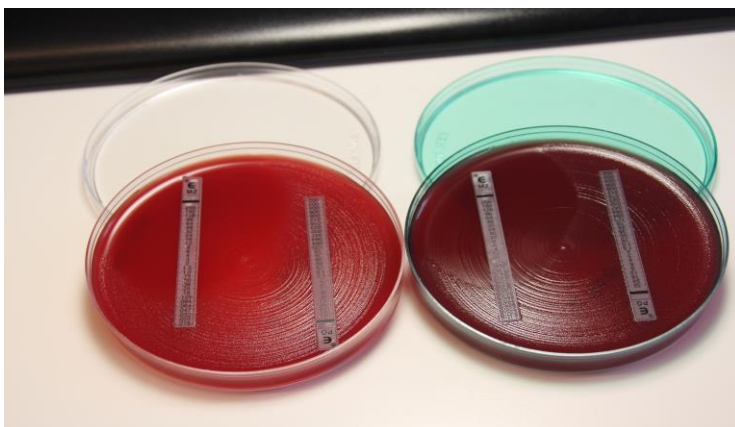
Molemmat maljat valmistetaan HUSLABin elatusainetuotannossa samalla ohjelmalla, jossa verta lukuun ottamatta kaikki aineet kuumennetaan steriilissä ja suljetussa keittimessä 121 celsiusasteessa 15 minuutin ajan, jonka jälkeen se jäähdytetään 50 asteeseen ja lisätään veri. Tämä lämpötila on laskettu niin, että liuos pysyy vielä nestemäisenä, mutta jäähtyy nopeasti annosteltaessa. Tämän jälkeen elatusaine annostellaan maljoille ja jäähdytetään huoneenlämmössä kiinteäksi.

3.5.1 Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja

Tällä hetkellä Brucella-maljaa käytetään muun muassa hammasnäytteissä. Testauksessa käytetty malja valmistetaan käyttäen BD:n teollisesti valmistamaa Brucella-agaria, Hemin-liuosta, K1-vitamiinia sekä pakastettua ja lyysattua lampaan verta. Valmistuttuaan se säilyy käyttökelpoisena neljä viikkoa. Valmiin maljan pH on 6,8–7,2, siinä on K1 vitamiinia ja Heminiä 5 mcg/ml. (Hilla 2015a.)

3.5.2 Wilkins–Chalgren-malja

Wilkins–Chalgren-maljaa käytetään vielä tällä hetkellä anaerobibakteerien herkkyysmäärityksissä HUSLABin bakteriologian osastolla. Se valmistetaan Oxoid'in teollisesti tuottamasta Wilkins–Chalgren-agarista, lampaan verestä, Menadionliuoksesta sekä tislatus vedestä ja sen käyttöikä valmistuksen jälkeen on kaksi viikkoa. Valmiin maljan pH on 7,2–7,6. (Hilla 2015a.)



Kuvio 2. Vasemmalla vaaleassa kuoressa Brucella + K1-vitamiini + Hemiini -malja ja oikealla vihreässä kuoressa Wilkins–Chalgren-malja.

3.6 Aiempaa tutkimustietoa anaerobibakteereiden herkkyysmäärittämisestä

Infectious Diseases Society of America -järjestö on myös tehnyt aiheesta tutkimuksen, jossa vertailtiin Wilkins–Chalgren- sekä Brucella +K1-vitamiini + hemiini -maljoja anaerobibakteerien herkkyysmäärittämisessä ja niiden MIC-arvoissa. Erona tähän opinnäytetyöhön, kyseissä tutkimuksissa oli käytössä erilainen antibioottipaneeli sekä laajempi kirjo bakteereja. Tulosten luotettavuutta ja käytettävyyttä lisää aiemmassa tutkimuksessa myös se, että viljelyt suoritettiin viidessä eri laboratoriossa ympäri Yhdysvaltoja. Neljässä näistä ei havaittu mainittavaa eroa saaduissa tuloksissa, mutta viidennen tulokset olivat yli puolissa saaduista arvoista muita laboratorioita korkeampia. Koska kuitenkin myös kontrolliarvot MIC-testeille tässä laboratoriossa olivat yli raja-arvojen, todettiin tutkimuksessa sen johtuvan inhimillisistä virheistä. (Roe ym. 2002.)

Kyseinen vuonna 2002 tehty tutkimus lähti liikkeelle samoista lähtökohdista kuin tämäkin opinnäytetyö. Haluttiin tietää, voitaisiinko WC-malja korjata Br-maljalla. WC-malja on kansainvälisesti yleisesti käytössä oleva malja, jonka standardointia anaerobibakteereille ehdotettiin vuonna 1979. Mikäli saataisiin standardi yhdelle maljalle, tulisi laboratorioiden välisistä tuloksista vertailukelpoisempia. Myöhemmin kuitenkin huomattiin, että WC-maljalla kaikki bakteerit eivät kasva hyvin tai ollenkaan, joten alettiin etsiä muita vaihtoehtoja. Tutkimuksen perusteella Br-maljalla kasvoivat paremmin ne bakteerit, jotka eivät WC-maljalle sopeutuneet. Lisäksi MIC-testien arvot näiden maljojen välillä eivät eronneet mainittavasti, lukuun ottamatta ceftizoximea, jolla tosin on ennenkin todettu vaihtelevia MIC-arvoja. Muut tutkimuksessa käytössä olleet antibiootit olivat klindamysiini, metronidatsoli, trovafloksasiini, piperasilliini sekä kefoksitiini. (Roe ym. 2002.)

Tämän lisäksi vuonna 2014 tehtiin tutkimus käyttäen *Bacteroides fragilis* -bakteeria. Tämän tarkoituksena oli nimenomaan luoda ensimmäinen EUCAST-standardi anaerobibakteereille. Tutkimus tehtiin samaa Br-maljaa käyttäen. (Nagy ym. 2014.) Mikäli tutkimuksen pohjalta saataisiin Br-malja standardoitua herkkyysmäärittäykseen, tukisi se myös bakteriologian osaston siirtymistä kyseiseen maljaan.

Molemmat aiemmat tutkimukset erosivat bakteerimäärissä sekä antibiooteissa tästä opinnäytetyöstä, mutta niiden käytännön tarkoitus ja toteutus oli samanlainen. Täydellistä vastaavuutta ei mistään löydy, mutta vaikka jotkin komponentit erosivatkin, ovat ne vertailukelpoisia keskenään siinä mielessä että kaikissa oli tarkoituksena testata samaa Br-maljaa ja anaerobibakteerien kasvua sillä.

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat

Tämän työn tarkoituksena oli testata, miten Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja toimii anaerobibakteereiden antibioottiherkkyysmäärittäyksessä. Vertailussa käytettiin toistaiseksi anaerobibakteereiden herkkyysmäärittäyksissä käytössä olevaa Wilkins–Chalgren-maljaa.

Testauksessa vertailtiin kahta eri maljaa, joita käytetään HUSLABin bakteriologian osastolla anaerobibakteereille. Lopputuloksena tarkoitus on siirtyä käyttämään pelkästään Br-maljaa kaikille anaerobibakteereiden antibioottiherkkyysmäärittäyksille sen jälkeen kun sitä on testattu tarpeeksi jotta sen toimivuuteen voidaan luottaa. Tämä idea Br-maljan käytöstä oli lähtöisin bakteriologian osaston asiantuntijoilta. Testauksessa tälle maljalle tehtiin herkkyysmäärittäys antibioottikiekoilla ja MIC-testeillä, joita pidetään siis tarkimpana rutiinilaboratorioon soveltuvana menetelmänä tällä hetkellä. Antibioottiherkkyuden määrittäminen kiekkomenetelmää käyttäen on kuitenkin selkeästi helpompaa ja käytännöllisempää, kuin että kaikkiin määrittäyksiin käytettäisiin MIC-testejä. Tähän syynä on esimerkiksi yksinkertaisesti se, että antibioottikiekoja saa yhdelle maljalle useampia (Tarkka 2015a; Hilla 2015b.)

Tavoitteena oli saada aikaan yhteneväinen ja selkeä tapa anaerobibakteerien antibioottiherkkyysmäärittäyksen tekoon. Käytännössä ajateltiin, että Br-maljan käyttö herkkyysmaljana selkeyttäisi laboratorioprosessia, sillä siirryttäessä käyttämään kokonaan Br-

maljaa, vähenisi ja helpottuisi elatusainetuotanto, varastointi, maljojen laadunvalvonta sekä ohjeistukset työskentelyyn huomattavasti. Tähän syynä olisi se, että WC-malja voitaisiin karsia maljavalikoimasta kokonaan. (Hilla 2015a.)

Opinnäytetyössä selvitettiin siis, toimiiko Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja tutkittujen anaerobibakteerien herkkyyismäärityksissä.

Opinnäytetyön muodostuivat seuraavat tutkimusongelmat:

- Miten tutkittavat anaerobibakteerit kasvavat Br-maljalla?
- Miten antibioottien aiheuttamat estot eroavat toisistaan Br-maljalla ja WC-maljalla testaukseen käytettävillä bakteereilla?

5 Toteutus

Käytännön toteutus suoritettiin HUSLABin klinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla viikoilla seitsemän ja kahdeksan. Testausta tehdessä käytettiin samoja tiloja ja välineitä kuin normaalistikin potilasnäytteiden kanssa. Toiminta ajoitettiin niin, että se häiritsisi mahdollisimman vähän laboratorion rutiinitoimintaa.

Aikataulu laadittiin siten, että siinä oli jonkin verran joustovaraa mahdollisten ongelmien vuoksi. Esimerkiksi tutkimuslupa hankittiin jo ennen joulua, jotta tarvittaessa olisi voitu aloittaa käytännön testauksen valmistelut jo harjoittelujakson aikana bakteriologialla.

Taulukko 1. Aikataulu.

Opinnäytetyön aihe ja aiheen jäsenitys	2015/viikko 39
Aiheseminaari	29.9.2015
Suunnitelman työstö	2015/viikot 41–43
Ohjaavan opettajan tapaaminen	22.10.2015
Suunnitelman viimeistely ja palautus	Viim. 5.11.2015
Suunnitelmaseminaari	10.11.2015
Sopimus opintoihin liittyvästä projektista ja tutkimusluvan haaku	Marraskuu 2015
Harjoittelu bakteriologian osastolla	2016/viikot 2–6
Käytännön toteutus	2016/viikot 7–9
Raportin kirjoitus	2016/viikot 9–13
Opinnäytetyön palautus	6.4.2016
Opinnäytetyön esittäminen seminaarissa	12.4.2016
Raportin lopullinen palautus	21.4.2016

Käytännön testauksessa oli tarkoitus käyttää anaerobikaappia, missä kaikille maljoille olisi saatu taattua samanlaiset ja optimaaliset kasvuolosuhteet heti suspension levittämisen ja antibioottien maljalle laiton jälkeen. Lisäksi kaapissa kasvatettuja näytteitä oli helpompi tarkkailla välillä ilman, että niiden olosuhteet häiriintyivät. Käytännössä kuitenkin työ toteutettiin niin, että toiset rinnakkaisista näytteistä kasvatettiin anaerobikaapissa, mutta toiset jouduttiin kasvattamaan anaerobipytyissä anaerobikaappiin tulleen vian johdosta. Molemmissa on kuitenkin samanlaiset anaerobiset olosuhteet ja niitä tarkkailtiin samalla metodilla; kaupallisilla BD:n valmistamilla anaerobioosin indikaattoriliuskoilla. Nämä liuskat ovat normaaleissa hapellisissa olosuhteissa sinisiä, mutta värjäytyvät hapettomissa olosuhteissa valkoisiksi. Tällä värimuutoksella voidaan helposti ja nopeasti todeta anaerobioosin olemassaolo.

Anaerobipytyyn huono puoli on se, ettei sitä voida avata kesken kasvatuksen ilman, että maljat altistuvat hapelle. Siksi maljoja ei voitu tarkkailla joka päivä. Koska ensimmäinen sarja jokaisesta bakteerista oli jo kasvatettu anaerobikaapissa ja tiedettiin niiden kasvunopeus, voitiin toistokerrallakin olla häiritsemättä niiden kasvuolosuhteita. Käytännössä tämä tarkoitti sitä, että kun tiedettiin *Prevotella intermedia* ja *Propionibacterium acnes* -bakteerien vaativan kahden vuorokauden kasvatuksen, ei näitä pyytyjä avattu heti vuorokauden kuluttua kuten *Bacteroides fragilis* ja *Clostridium perfringens* -bakteerien kasvuastiat.

5.1 Testatut bakteerit ja antibiootit

Tutkittaessa, soveltuuko Br-malja hyvin antibioottil herkkyysmäärittäykseen, käytettiin siis seuraavia bakteereja: *Clostridium perfringens* ATCC-13124, *Bacteroides fragilis* ATCC-25285, *Prevotella intermedia* ATCC-25611 ja *Propionibacterium acnes* ATCC-6919 sekä penisilliini-, metronidatsoli-, klindamysiini-, doksisykliini-, imipeneemi- ja amoksisilliini-klavulaanihappo-antibiootteja. Testattavat bakteerit ja antibiootit työhön valitsi mikrobiologi Eveliina Tarkka ja laboratorion kliininen asiantuntija Risto Hilla, joka kylläkin käytännön työn aloitushetkellä oli siirtynyt toisiin työtehtäviin. Varsinaisessa käytännön työssä avusti bioanalyttikko Hanna Vaitinen.

Maljojen vertailussa käytettiin bakteerien tunnetuista ATCC-kannoista tehtyjä tarkkoja 0,5 vahvuisia MacFarland-suspensioita, joilla taattiin tutkimuksen toistettavuus. Suspensioiden vahvuus herkkyysmäärittäykseen on standardin mukainen, ja se mitattiin den-

sitometrillä. ATCC-kannat ovat kansainvälisesti hyväksyttyjä mikrobikantakokoelmia. Niissä on yleensä saman lajin eri edustajia ja ne tulevat American Type Culture Collection -nimiseltä organisaatiolta, jolla on laaja kokoelma mikrobikantoja. Näitä käytetään laboratorioissa viljely ja tunnistusmenetelmien laadunvalvontaan ja -ohjaukseen sekä menetelmien validointiin. Ne ovat tunnettuja kantoja ja niistä käytetään myös nimeä referenssi- tai kontrollikannat, sillä niiden avulla voidaan varmistaa menetelmien ja tulosten toimivuus sekä oikeellisuus, kun niiden ominaisuudet tunnetaan valmiiksi ja käytettävä kanta on varmennettu oikeaksi. (ATCC 2014.)

5.2 Käytännön toteutus ja siihen käytetyt välineet

Käytännössä kaikista bakteereista tehtiin ensin tarkat suspensiot, joiden oikea vahvuus varmistettiin mittaamalla densitometrillä. Tämän jälkeen suspensiota levitettiin tasaisesti maljoille pumpulitikulla pyörittäjän avulla. Jokaisesta bakteerista tehtiin WC- ja Br-maljoille E-testi sekä Br-maljalle vielä lisäksi kiekkotesti. Antibioottikiekkot annosteltiin maljoille annostelupaneelin avulla, jolloin maljalle saatiin aina kolme antibioottikiekkoa kerrallaan. Toistovaiheessa joitain kiekkoja laitettiin maljoille myös käsin manuaalisesti pinseteillä, jotta ne saatiin aseteltua paremmin ja suuret estokehät oli helpompi mitata. E-testiliuskat laitettiin maljoille joko vakuumisirrostan avulla tai pinseteillä, varoen ettei liuskan ja maljan väliin jää ilmaa jotta lääke pääsee imeytymään maljaan tasaisesti. MIC-testiä käytettiin tutkimuksessa niin sanottuna standardimenetelmänä, jota voisi verrata antibioottikiekkojen estorenkaiden kokoon. Kiekkomenetelmälle anaerobibakteereilla ei ole standardoitua menetelmää, eikä näin ollen tiettyjä estorengasmittoja, jotka kertoisivat resistenssistä tai sensitiivisyydestä. Vertailuna tehtiin lisäksi MIC-määrytykset myös nykyisin käytössä olevalle Wilkins–Chalgren(WC)-maljalle. (Tarkka 2015a; Hilla 2015b.)

E-testi vaatii enemmän tilaa maljalla kuin kiekkotesti, sillä niitä saa enintään kaksi samalle maljalle, kun taas kiekkoja voisi teoriassa laittaa jopa viisi samalle maljalle. Kuitenkin anaerobibakteerien kohdalla kiekkojen estorenkaiden koot ovat yleisesti niin suuria, että käytännössä niitä laitetaan enintään kolme maljaa kohden. Joka tapauksessa, kun testattavia antibiootteja oli kuusi erilaista, yksi bakteeri vaati jokaista E-testiä varten kolme kutakin maljaa ja Br-maljoja kiekkotestejä varten vielä lisäksi kolme. Periaatteessa tähän riittäisi kaksi maljaa, mutta koska työssä käytettiin bakteriologian osaston työvälineitä, antibiootit jakaantuvat kolmeen eri annostelupaneeliin (kolme lääkettä/paneeli) ja yhdessä sairaalamikrobiologi Eveliina Tarkan kanssa sovittiin, että on

yksinkertaisempaa annostella ylimääräisiä antibiootteja kuin ottaa kiekot annostelijoista ja siirtää maljalle käsin. Näin saatiin vielä amoksisilliini-klavulaanihappo-antibioottikiekot jokaisella testauskerralla maljoille kahdesti. Lisäksi ainakin osalla bakteereista oli odotettavissa suuriakin herkkyyksiä, jolloin estokehän suuruus oli helpompi mitata, kun maljalla oli vain kolme kiekkoa kerrallaan. Kaikki testit tehtiin kahdesti toistettavuuden varmistamiseksi, eli tutkimukseen oli tarkoitus käyttää yhteensä 24 WC-maljaa ja 48 Br-maljaa (taulukko 1. ja 2.). Kuten jo aiemmin on mainittu, puolet maljoista kasvatettiin anaerobikaapissa ja puolet taas anaerobipytyissä.

Käytettyjen maljojen määrä kuitenkin kasvoi suunnitellusta työn aikana, sillä ensimmäisellä kierroksella huomattiin *Propionibacterium acnes*- ja *Prevotella intermedia*-bakteerien kasvun estyvän niin suuresti joidenkin antibioottien vaikutuksesta, että tulosten luotettavuuden takaamiseksi tuli joitakin E-testejä laittaa vain yksi maljaa kohden ja joitakin antibioottiekkoja vain kaksi maljaa kohden toista kasvatusta varten. Ensimmäiset kasvatukset kustakin bakteerista menivät vielä suunniteltujen maljamäärien mukaan, mutta toisella kierroksella niitä käytettiin muutama enemmän (taulukko 2. ja 3.)

Näiden maljojen lisäksi jokaisesta bakteerisuspensiosta tehtiin laadunvarmistuksena häntämalja, jolta voitiin tarkistaa että herkkyyteen oli käytetty puhdasta suspensiota. Häntämaljana käytettiin FAA-maljaa joka on yleinen anaerobeille käytetty malja. Näitä tarvittiin rinnakkaismittaukset huomioon ottaen kahdeksan kappaletta.

Taulukko 2. Käytetyt Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljat

BRUCELLA + K1-VITAMIINI + HEMIINI -MALJA	E-testi	Kiekkotesti	E-testi toisto	Kiekkotestin toisto
<i>Clostridium perfringens</i>	3 maljaa	3 maljaa	3 maljaa	3 maljaa
<i>Bacteroides fragilis</i>	3 maljaa	3 maljaa	3 maljaa	3 maljaa
<i>Prevotella intermedia</i>	3 maljaa	3 maljaa	5 maljaa	3 maljaa
<i>Propionibacterium acnes</i>	3 maljaa	3 maljaa	4 maljaa	3 maljaa
Yhteensä	12 maljaa	12 maljaa	15 maljaa	12 maljaa

Taulukko 3. Käytetyt Wilkins–Chalgren-maljat.

WILKINS–CHALGREN-MALJA	E-testi	E-testin toisto
<i>Clostridium perfringens</i>	3 maljaa	3 maljaa
<i>Bacteroides fragilis</i>	3 maljaa	3 maljaa
<i>Prevotella intermedia</i>	3 maljaa	5 maljaa
<i>Propionibacterium acnes</i>	3 maljaa	4 maljaa
Yhteensä	12 maljaa	15 maljaa

Maljojen lisäksi pieniä kustannuksia aiheuttivat muut viljelyssä tarvittavat välineet, esimerkiksi viljelysauvat ja silmukat. Lisäksi kustannuksia syntyi käytettävistä antibiooteista. Käytetyt määrät näitä välineitä ja maljoja olivat kuitenkin niin pieniä, ettei testaus juurikaan muuttanut niiden päivittäistä menekkiä laboratoriossa.

Tuloksina siis saatiin tietoa siitä kasvavatko bakteerit Br-maljalla ja lisänä MIC-testien numeerisia arvoja sekä mitattuja kiekkojen estorenkaita Br-maljalta. Kasvua tarkasteltiin ja vertailtiin maljoilta silmämääräisesti. Tarkat tulokset mitattiin antibiottikiekoista viivaimen avulla ja MIC-testien tulokset tarkasteltiin liuskalta. Estorenkaita ja MIC-arvot luettiin 100 % eston kohdalta eli kohdasta, jossa kasvu on täysin estynyt. MIC-testejä tulkittiin niiden valmistajan ohjeiden mukaisesti, eli esimerkiksi sellaisissa tilanteissa joissa kasvu on erilaista liuskan eri puolilla. Nämä tulokset taulukoitiin ja verrattiin jokaisen bakteerin kohdalla erikseen. Eri bakteerien tuloksia ei voida verrata keskenään mitenkään, kuten ei myöskään eri antibiootteja, sillä kaikkien testattavien bakteereiden antibioottiherkkyys on luonnollisesti erilainen. Tämän vuoksi verrattiin jokaisen bakteerin kohdalla jokaisen antibiootin antamia estoarvoja keskenään; kaksi testiä WC-maljalla ja kaksi testiä Br-maljalla. Nämä katsottiin niin, että saman maljan tulokset ovat korkeintaan 2–3 asteikon päässä toisistaan ja sitten verrattiin vielä maljoja keskenään. Tällä vastattiin toiseen tutkimusongelmaan, eli saadaanko Br-maljalla ja WC-maljalla samanlaiset estot antibiooteille.

MIC-liuskojen sekä antibiottikiekkojen estoja luettiin molempien opinnäytetyön tekijöiden toimesta, ja lisäksi opinnäytetyön ohjaaja kävi myös aluksi tarkistamassa ensimmäiset luetut maljat ja niiltä saadut arvot. Näin saatiin varmistettua, että mitatut kiekkojen estot ja MIC-testit tulkittiin samalla tavalla ja oikein. Kaikki tulokset taulukoitiin ja rinnakkaisia tuloksia verrattiin keskenään. MIC-arvot saatiin katsomalla maljalta sellai-

nen luku E-testiliuskalta, jonka kohdalla ei ollut lainkaan bakteerikasvua. Kiekkotestin arvot saatiin mittaamalla viivaimella antibiootin aiheuttaman estorenkään halkaisijan mitta niin ikään sellaisesta kohdasta, jossa kasvua ei ollut lainkaan havaittavissa.

6 Tulokset

Seuraavaksi tulokset on esitelty tarkemmin. Tutkimusongelmina olivat miten tutkittavat anaerobibakteerit kasvavat Br-maljalla sekä miten antibioottien aiheuttamat estot eroavat toisistaan Br-maljalla ja WC-maljalla testaukseen käytettävillä bakteereilla. Näitä käsitellään tarkemmin yhteenvedossa, mutta ensin jokaisen bakteerin tulokset on eritetty ja taulukoitu yksi kerrallaan. Taulukossa vasemmalla olevat tulokset ovat anaerobikaapissa kasvatetuilta maljoilta ja oikealla ovat anaerobipytyssä kasvaneiden maljojen tulokset. Bakteerit ovat erilaisia ja ne reagoivat eri tavalla antibiootteihin; esimerkiksi *Bacteroides fragilis* on penisilliinille täysin resistentti, kun taas *Clostridium perfringens* on sille hyvin herkkä. Tämän takia ei bakteereita voida verrata keskenään.

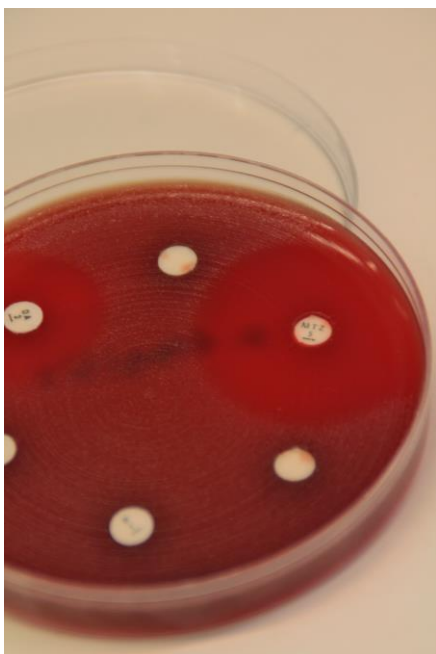
6.1 *Bacteroides fragilis*

Bacteroides fragilis on suhteellisen nopeakasvuinen bakteeri, ja sitä kasvatettiin molemmilla toistokerroilla noin vuorokauden ajan. Antibioottikiekkojen ja MIC-liuskojen aiheuttamat estot olivat selkeitä ja suhteellisen helppolukuisia. Mitatut estot on koottu taulukkoon. Siitä on havaittavissa, että molempien maljojen kohdalla penisilliini oli täysin resistentti sekä MIC-testeillä että kiekkotestin kohdalla. Myös metronidatsoli, doksisykliini, imipeneemi ja amoksisilliini-klavulaanihappo toimivat molemmilla maljoilla ja maljojen rinnakkaisilla samalla tavalla; estot olivat enintään yhden asteikon päässä toisistaan. Klindamysiinin kohdalla toistettavuus WC-maljalla oli erittäin hyvä, mutta Br-maljalla estot olivat sekä keskenään että verrattaessa WC-maljaan hyvin erilaisia.

Taulukko 4. *Bacteroides fragilis*, maljoilta mitatut estot.

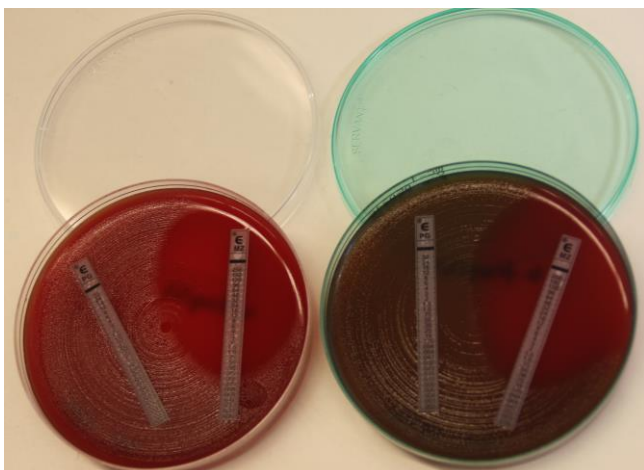
Antibiootti	WC -malja		Br -malja				
	mic	mic-toisto	mic	mic-toisto	kiekko	kiekko-toisto	
Penisilliini	> 32	>32	>32	>32	0	0	
Metronidatsoli	0,25	0,25	0,19	0,19	38	37	
Klindamysiini	0,25	0,25	1	1,5	26	15	
Doksisykliini	0,094	0,094	0,094	0,125	39	40	
Amoksisilliini + klavulaanihappo	0,19	0,19	0,19	0,19	37	37	40 39
Imipeneemi	0,047	0,032	0,047	0,032	42	43	

Ensimmäisellä testauksella antibioottien annostelupaneelissa oli jotain vikaa, mikä aiheutti sen että metronidatsolikiekkko upposi kiekottaessa hieman agarin sisään. Estokehä kiekolle oli kuitenkin selkeä, ja myös toistettavuus oli hyvä vaikka toisella kerralla kiekko olikin normaalisti agarin päällä. Tästä voidaan päätellä, että tällainen pieni poikkeama ei vaikuta antibiootin tehoon ja bakteerin kasvuun Br-maljalla.



Kuvio 3. *Bacteroides fragilis*, metronidatsolikiekkko hieman agarin sisällä.

Suurimman osan antibiooteista kohdalla merkittävää eroa maljojen välillä ei ollut, ja myös toistokerralla tulokset olivat hyvin samansuuntaisia. Kuitenkin klindamysiinin kohdalla tuloksia ei voida vertailla, sillä sen lisäksi, että sen MIC-tulokset olivat Br-maljalla suurempia kuin WC-maljalla, myös Br-maljalla saadut rinnakkaiset tulokset olivat melko kaukana toisistaan. Tämän lisäksi klindamysiinikiekkojenkin toistettavuudessa oli eroa. Selkeää syytä näihin eroihin ilman jatkotutkimuksia on mahdotonta sanoa.



Kuvio 4. *Bacteroides fragilis*, penisilliini- ja metronidatsoli-MIC:it Br- ja WC-maljoilla.

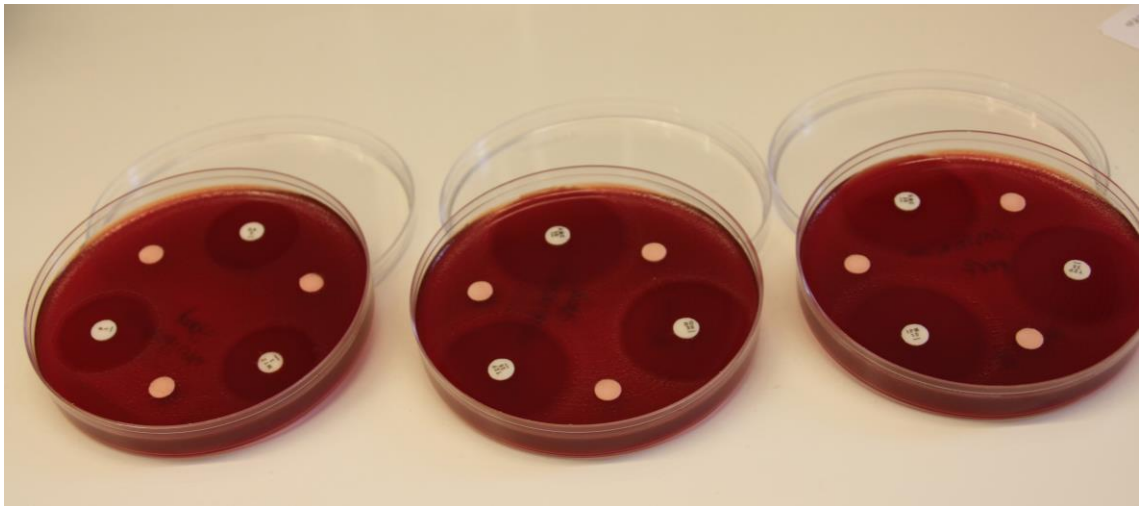
6.2 *Clostridium perfringens*

*B. fragiliks*en tavoin *C. perfringens*ä kasvatettiin molemmilla toistokerroilla noin vuorokauden ajan. Siinä ajassa bakteeri ehti hyvin kasvaa, ja antibioottien aiheuttamat estot olivat selkeitä lukea ja mitata. Taulukosta voidaan nähdä kuinka kaikki antibiootit olivat sekä WC-maljalla että Br-maljalla hyvin samanlaisia; erot enintään yhden MIC-testin asteikon tai 1–2 mm päässä toisistaan ja penisilliinin kohdalla jopa täysin identtisiä läpi sarjan. Tämä on normaalivaihtelua; samakaan bakteerikanta ei välttämättä joka kasvatuskerralla anna täysin identtistä tulosta, mutta on toki samalla tavalla joko herkkä tai resistentti.

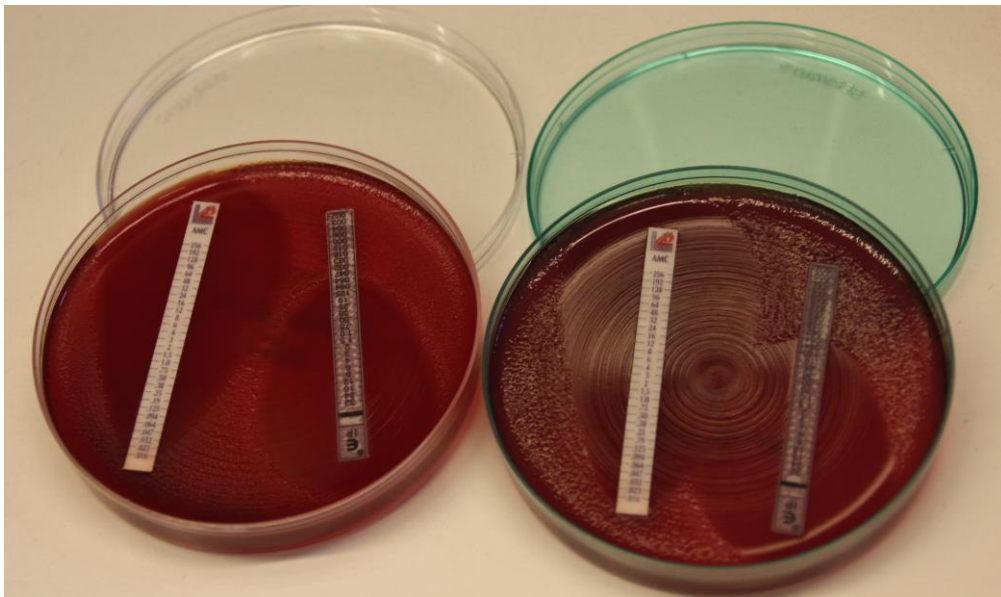
Taulukko 5. *Clostridium perfringens*, maljoilta mitatut estot.

Antibiootti	WC-malja		Br-malja				
	mic	mic-toisto	mic	mic-toisto	kiekko	kiekko-toisto	
Penisilliini	0,064	0,064	0,064	0,064	27	27	
Metronidatsoli	0,5	0,75	0,75	0,5	22	24	
Klindamysiini	0,19	0,19	0,19	0,19	25	24	
Doksisykliini	0,047	0,047	0,064	0,047	32	33	
Amoksisilliini + klavulaanihappo	0,016	0,016	0,023	0,032	37	38	38
Imipeneemi	0,064	0,064	0,064	0,094	34	33	

Tuloksia tarkasteltaessa voidaan sanoa, että *C. perfringens* kasvaa yhtä hyvin molemmilla testaukseen käytetyillä maljoilla ja antibiootit vaikuttavat samalla tavoin. Maljojen ja myös toistojen väliset erot ovat lähes olemattomat. Bakteerin estokehät ja MIC-arvot olivat helppolukuisia molemmilla maljoilla.



Kuvio 5. *Clostridium perfringens*, kaikki antibioottikiekot.



Kuvio 6. *C. Perfringens*, amoksisilliini-klavulaanihappo- ja imipeneemi-MIC:it Br- ja WC-maljoilla.

Myös tällä bakteerilla metronidatsoliekko oli hieman rikkonut agarin pintaa kiekottajan vuoksi ensimmäisellä testauskerralla, mutta silti toistokerralla tulos ei poikkea juurikaan.

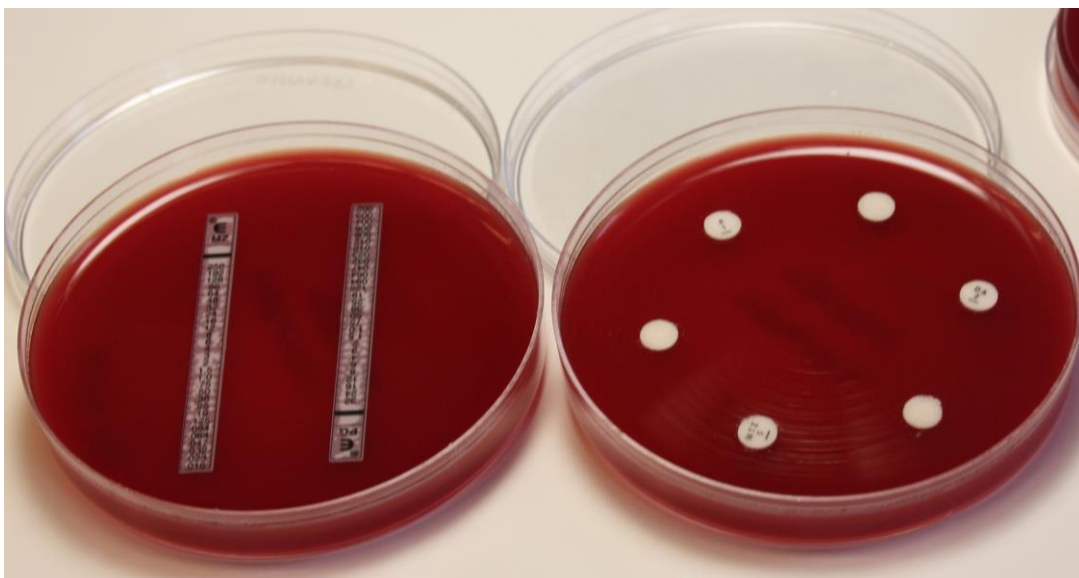
6.3 *Prevotella intermedia*

P. intermedia on hitaammin kasvava bakteeri, ja kun sitä tarkasteltiin ensimmäisellä testauskerralla päivän kasvatuksen jälkeen anaerobikaapissa, oli antibioottikiekkojen ja MIC-liuskojen estoja mahdotonta vielä mitata ja tulkita. Kahden päivän kasvatuksen jälkeen kasvu maljoilla oli selkeämpää. Tulokset ovat hieman erilaisia keskenään. Ainoastaan klindamysiini on täysin identtinen MIC-testien arvoissa sekä WC-maljalla että Br-maljalla. Muissa rinnakkaiset arvot eivät ole täysin verrattavissa kummallakaan maljalla, mutta taas molempien jälkimmäisessä kasvatuksessa saadut arvot ovat keskenään melko samanlaisia. Kaikki antavat toki tulokseksi, että bakteeri on herkkä.

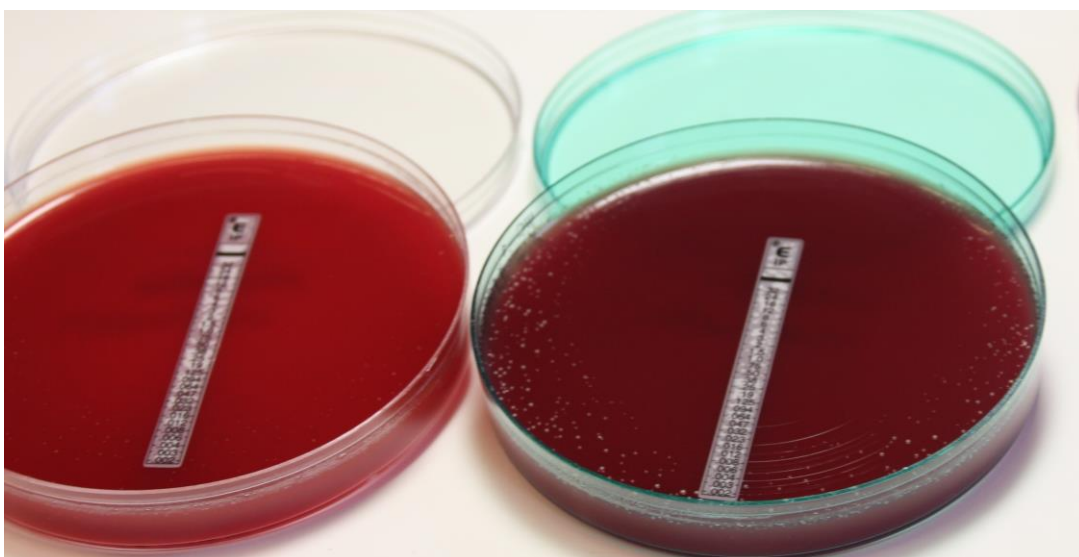
Taulukko 6. *Prevotella intermedia*, maljoilta mitatut estot.

Antibiootti	WC -malja		Br -malja				
	mic	mic-toisto	mic	mic-toisto	kiekko	kiekko-toisto	
Penisilliini	0,012	0,002	0,032	<0,002	39	46	
Metronidatsoli	0,25	0,023	0,125	<0,016	36	50	
Klindamysiini	<0,016	<0,016	<0,016	<0,016	56	>60	
Doksisykliini	0,094	0,023	0,094	0,023	>60	>60	
Amoksisilliini + klavulaanihappo	0,23	<0,016	0,23	<0,016	>60	>60	>60
Imipeneemi	0,23	0,006	0,23	0,008	>60	>60	

Tuloksista voidaan huomata, että *Prevotella intermedia* on hyvin herkkä testauksessa käytetyille antibiooteille. Ensimmäisellä testauskerralla oli maljoja, joilla ei näkynyt juuri mitään kasvua. Sen vuoksi toistokerralla laitettiin vain yksi MIC-liuska maljaa kohden, jotta voitiin todeta että antibiootti tosiaan aiheuttaa niin suuren eston bakteerin kasvulle. Myös kiekkojen määrää vähennettiin niin, että suurimmat estot ensimmäisellä kerralla antaneita kiekkoja laitettiin kolmen sijasta kaksi samalle maljalle. Silti toisellakin kerralla kasvua oli hyvin vähän ja se teki luettavuudesta vaikeaa. Tästä voivat johtua erot havaituissa estoissa.



Kuvio 7. *Prevotella intermedia*, lähes olematon kasvu Br-maljalla. Antibiootteina metronidatsoli- ja penisilliini-MIC:it ja -kiekot sekä klindamysiinikiekkko.



Kuvio 8. *P. intermedia*, imipeneemi-MIC:it Br- ja WC-maljoilla.

Näin herkän bakteerin kanssa kiekkomääritys on hankala menetelmä, sillä suuret estorenkaat on vaikea mitata. Tässä testauksessa päädyttiin käyttämään näistä todella suurista estorenhäistä merkintää ">60". Tätä pienemmät estokehät ovat vielä mitattavissa niin, että mitataan matka kiekon keskustasta bakteerikasvun rajaan ja kerrotaan se kahdella. Näin saadaan tarkka mitta estokehälle, vaikka se ei mahtuisikaan kokonaan maljalle.



Kuvio 9. *P. intermedia*, amoksisilliini-klavulaanihappo- ja imipeneemikiekot. Kasvua nähtävissä vain vähän maljan reunoilla mahdollisimman kaukana kiekoista, eli estokehän suuruus >60.

Myös toistettavuudessa kiekkotestien kohdalla voidaan huomata suurempia eroja kuin muilla bakteereilla niiden antibioottien osalta, joilla estokehän koko oli mitattavissa. Se kertoo siitä, että hidaskasvuinen bakteeri kiekkomenetelmää ei voida pitää luotettavana. Lisäksi antibioottien vahva vaikutus bakteeriin vaikeutti estojen tulkintoja huomattavasti. Siksi tämän bakteerin kohdalla estoja voidaan pitää lähinnä suuntaa antavina.

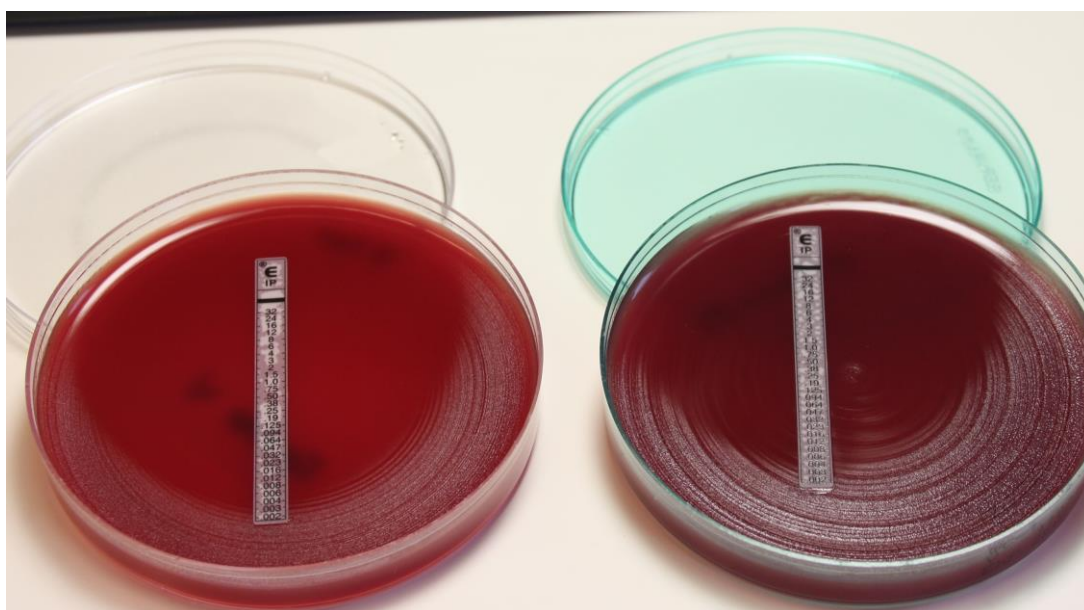
6.4 *Propionibacterium acnes*

Myös *P. acnes* on hidaskasvuinen bakteeri, ja sitä kasvatettiin kahden vuorokauden ajan jotta bakteeri kasvaisi niin että antibioottien aiheuttamat estot olisivat selkeitä lukea. Taulukosta voidaan huomata, että metronidatsoli, amoksisilliini-klavulaanihappo sekä klindamysiini antoivat MIC-testeissä molemmilla maljoilla ja molemmilla toistokeroilla täysin identtiset tulokset. Myös penisilliini, doksisykliini ja imipeneemi olivat enintään kahden asteikon päässä toisistaan MIC-testissä, eikä kiekkotestissäkään ollut normaalivaihtelua suurempaa eroa.

Taulukko 7. *Propionibacterium acnes*, maljoilta mitatut estot.

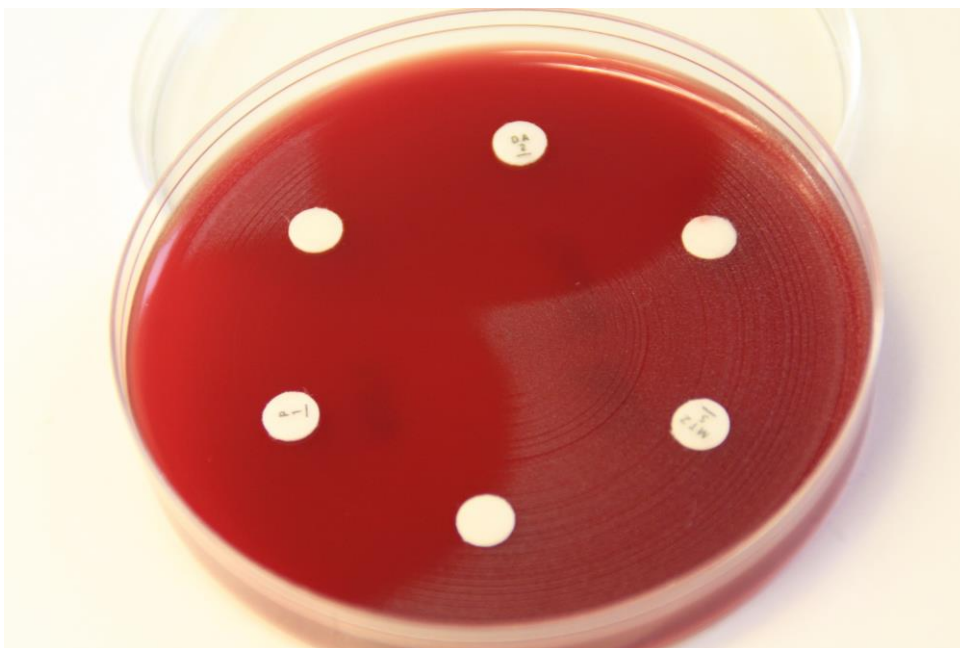
Antibiootti	WC -malja		Br -malja					
	mic	mic-toisto	mic	mic-toisto	kiekko		kiekko-toisto	
Penisilliini	0,006	0,006	0,012	0,012	47		45	
Metronidatsoli	>256	>256	>256	>256	0		0	
Klindamysiini	0,064	0,064	0,064	0,064	47		42	
Doksisykliini	0,094	0,125	0,125	0,25	48		44	
Amoksisilliini + klavulaanihappo	<0,016	<0,016	<0,016	0,016	>60	>60	>60	>60
Imipeneemi	<0,002	0,004	<0,002	0,004	>60		>60	

Myös. *P. acnesin* kohdalla muutamat antibiootit vaikuttivat niin voimakkaasti, että ensimmäisellä testauksella MIC-testit olivat vaikeita tulkita ja kiekkojen estorenkait mittaamattoman suuria. Niinpä toisella testauksella laitettiin amoksisilliini-klavulaanihappo- ja imipeneemi-MIC:it omille maljoilleen. Se helpotti lukemista ja näille antibiooteille saatiin myös pieniä tarkkoja pitoisuuksia mitatuksi.

Kuvio 10. *P. acnes*, imipeneemi-MIC:it Br- ja WC-maljoilla

Suuren estokehän ensimmäisellä kerralla antaneista antibiooteista laitettiin toistokerralla vain kaksi kiekkoa yhdelle maljalle, mutta se ei muuttanut tulosta vaan estokehät olivat mittaamattoman suuria.

Muuten *P. acnesin* antamat tulokset olivat hyvin samansuuntaisia sekä WC- että Br-maljoilla. Myös kiekkomäärityksellä saatiin hyvät rinnakkaiset arvot niiden antibioottien osalta, joiden estokehä oli helposti mitattavissa.



Kuvio 11. *P. Acnes*, penisilliini-, klindamysiini- ja metronidatsolikiekot Br-maljalla.

7 Tulosten tarkastelu

Vaikka tässä työssä käytännön toteutuksen tarkoituksena oli ensisijaisesti selvittää miten Br-malja soveltuu anaerobibakteerien herkkyysmäärittäykseen, saatiin tutkimuksesta paljon numeerisia tuloksia: sekä tarkkoja MIC-arvoja että estorenkaiden mittoja Br-maljalta ja lisäksi vertailukohdaksi WC-maljoilta myös MIC-testien tuloksia. Näiden tulosten avulla saatiin arvioitua Br-maljan soveltuvuutta anaerobibakteerien herkkyysmäärittäykseen. Tutkimusongelmina työssä oli selvittää miten bakteerit kasvavat Br-maljalla ja ovatko kahden käytetyn maljan välillä samanlaiset estot antibiooteilla. Bakteerien kasvaminen todettiin maljoja tarkastellen. Jokaisella viljellyllä maljalla oli kasvua, joten ensimmäinen tavoite toteutui täydellisesti ja voitiin todeta, että kaikki tutkittavat bakteerit kykenevät kasvamaan Br-maljalla.

Toista tutkimusongelmaa lähestyttiin vertaamalla molemmilta maljoilta saatuja MIC-tuloksia keskenään. Numeeriset tulokset taulukoitiin yhteen ja tarkasteltiin ensin, ovatko rinnakkaiset arvot samalla maljalla lähellä toisiaan (MIC-arvot 2–3 asteikon päässä toisistaan). Jonkin verran voi olla eri toistojen kanssa normaalia vaihtelua, eli tulosten ei ole pakko olla täysin identtisiä. Maljojen välisiä MIC-arvoja vertailemalla puolestaan saatiin selville, miten Br-malja soveltuu herkkyysmäärittäykseen eli tarkasteltiin ovatko estojen arvot molemmilla maljoilla samansuuntaiset. Lisäksi käyttäen hyväksi mikrobio-

logi Eveliina Tarkan ammattiosaamista sekä aiempaa tietoa kunkin antibiootin tehosta käytettäviin bakteereihin saatiin selville miten tutkittava malja soveltui näihin mittauksiin.

Lisäksi, kun testauksesta tuloksiksi saatiin MIC-arvojen lisäksi kiekkotestistä saatuja estorenkaiden kokoja, voitaisiin näiden kahden vertailua käyttää tukena kiekkoherkkyysien tulkinnessa bakteriologian osastolla. SIR-tulkintarajoja määrittäessä tarvittaisiin laajempi tutkimusasetelma. Tämä kuitenkin ei kuulunut tähän opinnäytetyöhön.

Työn tarkoituksena oli vertailla kahta eri maljaa, joten tarkkojen tulosten lisäksi mainittakoon, että maljoilla oli huomattava sävyero keskenään. Tämän vuoksi testausta tehtäessä koettiin Br-malja helpommaksi lukea; sille muodostui selkeämpi kontrastiero bakteerikasvun ja estorenkaiden välille. Lisäksi kaikki bakteerit kasvoivat hieman eri tavalla, mikä myös vaikutti tulosten lukemiseen. Esimerkiksi *Clostridium perfringens* oli muita selkeärajaisempi ja siten helppo katsoa molemmilta maljoilta.

Aiemman samankaltaisen tutkimuksen pohjalta voitiin jo olettaa, ettei testattavien kahden eri maljan välillä ole suuria eroja MIC-määrittelyssä. Lisäksi kyseinen tutkimus osoitti, että Brucella + K1-vitamiini + hemiini -malja sopii WC-maljaa paremmin anaerobibakteerien herkkyysmäärittelyyn, sillä Br-maljalla saatiin kasvamaan suurempi määrä eri bakteerilajeja kuin WC-maljalla. (Roe ym. 2002.)

Tämän työn tulokset WC- ja Br-maljoilla olivat samansuuntaisia ja kaikki tutkittavat bakteerit kasvoivat Br-maljalla kuten oletettiin. Myös lähes kaikki MIC-testit olivat hyvin samansuuntaisia molemmilla testauksessa käytetyillä maljoilla. Kuitenkin *Bacteroides fragiliksen* kohdalla klindamysiini ei ollut toistettava maljojen välillä tai Br-maljan rinnakkaisilla kasvatuksilla. Siksi klindamysiinin toimivuutta Br-maljalla tehtävissä antibiootterikkyysmäärittelyissä ei voida tämän työn perusteella kommentoida. Lisäksi *Prevotella intermedia* -bakteerin kohdalla tuloksissa todettiin jonkin verran eroa, sillä sen kasvu estyi niin paljon antibioottien vaikutuksesta, että estojen tulkinta oli hyvin hankalaa.

Vaikka tässä työssä kaikki tehtiin arkipäivinä ja maljat luettiin heti kasvatuksen jälkeen, heräsi bakteriologian arkityötä ajatellen laatukysymyksiä, kun testauksessa käytetyt maljat jätettiin päiväksi huoneenlämpöön kasvatuksen jälkeen. Rutiinistyössä potilasnäytteitä tulee tietenkin läpi viikon ja esimerkiksi perjantaina viljellyt herkkyysmäärittelyt kasvatetaan lukemiseen asti ja tämä tapahtuu vasta maanantaina. Maljoja säilytetäessä huomattiin, että WC-maljalla hemolysoivat bakteerit laajensivat hemolyysiä vielä

huoneenlämmössäkin, mikä teki estoista vaikeampia lukea. Br-maljalla tätä ongelmaa ei havaittu. Tätä ongelmaa ei myöskään havaittu, kun toisen kasvatuksen jälkeen *Bacteroides fragilis*- sekä *Clostridium perfringens* -bakteerien maljoja säilytettiin vuorokausi jääkaapissa.

8 Luotettavuus ja eettisyys

Laatuasioihin kiinnitettiin huomiota jokaisessa työvaiheessa, ja pyrittiin toimimaan niin että tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia. Tärkeä pohja luotettavalle tutkimukselle oli huolellinen työsuunnitelma ja taustatietoihin perehtyminen. Käytännön testauksessa ensimmäinen tarkastettu asia laadun kannalta oli jokaisen bakteerin kohdalla tehty perämalja. Kun todettiin, että kyseisellä maljalla oli puhdas bakteerikasvu, voitiin luottaa että testaukseen käytetty bakteerisuspensio oli puhdas ja saadut tulokset näin käyttökelpoisia.

Tämän lisäksi tulosten luotettavuutta arvioitiin rinnakkaisten mittausten toistuvuuden avulla. Lisäksi HUSLABin mikrobiologian osastolla opinnäytetyötä ohjannut mikrobiologi Eveliina Tarkka auttoi ammattitaidollaan ja kokemuksellaan arvioinnissa. Kaksi tutkittuista bakteereista oli erittäin herkkiä osalle antibiooteista. Nämä olivat *Propionibacterium acnes* sekä *Prevotella intermedia*. Tästä johtuen ensimmäisellä kasvatuksella maljoilla, joilla oli E-testit, oli hyvin vähän kasvua. Kuitenkin, kun seuraavalla kerralla laitettiin nämä antibiootit omille maljoilleen, voitiin todeta, että kasvua oli, mutta bakteeri on vain hyvin herkkä, jolloin aikaisempien tulosten voitiin sanoa olevan myös luotettavia. Lisäksi suuret estorenkoot kiekkotestissä samojen bakteerien kohdalla tukivat tätä päätelmää, vaikka kyseisten bakteerien kohdalla kiekkotesti ei ole varsinaisesti luotettava herkkyysmääritysmenetelmä.

Ainoastaan *Bacteroides fragilis* -bakteerin tulokset klindamysiinille eivät ole luotettavia tai toistettavia. Rinnakkaiset tulokset erosivat Br-maljalla sekä MIC-testien että kiekkotestien kohdalla keskenään. Mikäli tämä johtuisi eri kasvatusmenetelmistä; anaerobi-kaappi ja -pytty, tulisi eroja näkyä kaikkien bakteerien ja antibioottien kohdalla. Koska muut ovat verrattavissa keskenään, on mahdotonta sanoa tarkkaan mistä tämä ero voi johtua. Kyseessä voi olla tekninen virhe tai huntukasvusta johtuva tulkintavirhe. Samankaltaisia ongelmia oli *Prevotella intermedia* -bakteerin kohdalla, sillä sen kasvu estyi lähes jokaisen antibiootin vaikutuksesta niin paljon, että herkkyyssestojen tulkinta

oli haasteellista. Tämä saattaa aiheuttaa tulkintavirheitä, vaikka toki voidaan sen kohdalla silti sanoa onko bakteeri herkkä antibiooteille vai ei.

Koska bakteriologian osastolla olevan anaerobikaapin laaduntarkkailu oli ajan tasalla, ei opinnäytetyöllekään koitunut hidasteita tai muita ongelmia sen vian takia. Sen lisäksi, että kaapin käyttämiä kaasusäiliöitä tarkkaillaan päivittäin, kuuluu laadunvalvontaan myös anaerobioosin indikaattoriliuskat, jotka vaihdetaan kaappiin kerran päivässä ja tarkastetaan, että väri niissä muuttuu. Myös kaapin lämpötilaa seurataan jatkuvasti kalibroidun lämpömittarin avulla. Koska näiden ansioista huomattiin nopeasti laitteen mahdollinen toimimattomuus, voitiin osa tämän työn bakteereista laittaa suoraan anaerobipyttyihin kasvamaan. Anaerobipyttyjen laadunvalvontaa suoritettiin tarkkailemalla indikaattoriliuskoja silloin kun pyttyjä testauksessa käytettiin. Vaikka tämä toi testauskertoihin eroja ja poikkesi alkuperäisestä suunnitelmasta, ei tuloksissa huomattu juuriakaan vaihtelua joka voisi johtua nimenomaan kasvatusatmosfääristä. Molemmissa on samankaltainen atmosfääri ja laaduntarkkailu, joten periaatteessa bakteerikasvuun ja herkkyYTEEN ei tulisi vaikuttaa se, millä tavalla anaerobiset olosuhteet luodaan. Tässä työssä toki oli joidenkin rinnakkaisten välillä eroja, mutta koska se koskenut kaikkia bakteereita, eikä esim. *Bacteroides fragilis* -bakteerin klindamysiiniestoissa WC-maljalla havaittu eroja, on epätodennäköistä, että kasvatustapa vaikutti asiaan.

Luotettavuutta arvioidessa tulee ottaa huomioon myös se, että käytetyistä bakteereista kaksi edellä mainittua olivat hidaskasvuisempia eli niitä piti kasvattaa kaksi vuorokautta yhden sijaan. Näiden kohdalla normaalidiagnostiikassa ei edes käytetä kiekkomenetelmää, sillä se ei kahden päivän kasvatuksen kohdalla ole luotettava antibioottien diffuusion ollessa bakteerin kasvua nopeampaa. MIC-testi sen sijaan toimii samalla tavalla myös hidaskasvuisten bakteerien kanssa.

Koska tutkimuksessa ei käytetty lainkaan potilasnäytteitä, työn eettisyys ja sen arviointi perustuu ennen kaikkea saatuun tutkimuslupaan HUS-yhtymältä, mutta myös hyviin työ- ja toimintatapoihin, rehellisyyteen, huolelliseen työskentelyyn, tulosten tarkkaan tallentamiseen, arviointiin ja esittämiseen sekä tiedonhankinnan, tutkimuksen suorittamisen ja tulosten julkaisemisen avoimuuteen koko prosessin ajan. (Metropolia 2014.) Lisäksi tutkimus suunniteltiin ajallisesti niin, että se ei haitannut mikrobiologian laboratorion normaaliarkea ja potilasnäytteiden analysointia. Niinpä voidaan sanoa, että työ suoritettiin eettisten ja laadullisten periaatteiden mukaan ja niitä noudattaen.

9 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljan toimivuus anaerobibakteerien herkkyyismääryksissä ja mahdollisesti näiden tulosten perusteella korvata käytössä oleva Wilkins–Chalgren-malja kokonaan.

Opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan todeta tutkittavien bakteerien kasvavan sekä Brucella + K1-vitamiini + hemiini -maljalla että Wilkins–Chalgren-maljalla yhtä hyvin. Luettavuus Br-maljalla oli kuitenkin Wilkins–Chalgren-maljaan verrattuna parempi heti kasvatuksen jälkeen ja eritoten vuorokauden säilytyksen jälkeen, sillä bakteerikasvu säilyi Br-maljalla paremmin muuttumattomana. Lisäksi tulokseksi saatiin myös Br-maljalta kiekkomenetelmän estorengasmittoja, joiden perusteella HUSLABin bakteriologian osasto voi halutessaan tarkentaa heillä käytössä olevia raja-arvoja antibioottiherkkyyksissä.

Anaerobibakteereita on suuri määrä ja ne käyttäytyvät eri tavalla. Opinnäytetyössä tutkittiin neljää yleistä ja kasvuajoiltaan hieman erilaista bakteeria. Näistä kaksi voitiin lukea vuorokauden kasvatuksen jälkeen, kun taas kaksi vaati kahden vuorokauden kasvatuksen. Vaikka saadut tulokset puoltavat Br-maljan käyttöönottoa, ei tutkimuksen perusteella voida yleisesti sanoa Br-maljan toimivan yhtä hyvin jokaisen anaerobibakteerin kohdalla.

Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää HUSLABin mikrobiologian yksikön bakteriologian osastolla opinnäytetyön ohjaajan mikrobiologi Eveliina Tarkan ja muun asiantuntijaryhmän niin tahtoessa. Tulosten perusteella maljan vaihtoa voidaan harkita. Kun tiedetään lisäksi kiekkomenetelmän estorenkaiden mittoja, niitä voidaan mahdollisen vaihdon yhteydessä tarkentaa. Näitä voidaan siis verrata saatuihin MIC-arvoihin ja niitä voidaan käyttää tukena kiekkoherkkyysien tuloksin. Mahdollisesti voitaisiin vielä tutkia lisää eri bakteerilajeja ja laajentaa työtä tarkkojen SIR-tulkintarajojen määrittämiseksi.

Opinnäytetyön ATCC-kantojen määrä oli sopiva ottaen huomioon niiden hankalat kasvuolosuhteet sekä pidemmät kasvuajat. Vaikka tutkittavia bakteereja ei ollut paljon, työ oli hidasta, kun työskenneltiin anaerobibakteerien kanssa. Sen lisäksi että ne eivät kestä hapellisissa olosuhteissa kauan, ne eivät myöskään elä pitkään suspensiossa käytetyssä keittosuolaliuoksessa. Siksi jokainen bakteeri piti tehdä yksi kerrallaan, jotta aika ATCC-kannan sisältävän maljan siirtämisestä huoneilmaan ja sillä kasvaneen baktee-

rin saamisesta suspensioon, siitä herkkyysmaljoille ja vihdoin anaerobikaappiin tai -pyttyyn, olisi mahdollisimman lyhyt.

Opinnäytetyötä tehdessä opimme yleisesti anaerobibakteerien käyttäytymisestä ja niiden kasvatuksesta bakteriologian osastolla sekä tarkemmin käyttämistämme bakteereista ja antibiooteista. Jo tähän taustatietoon perehtyminen vei paljon aikaa ja oli työlästä, sillä koulun mikrobiologiaan liittyvällä opintojaksolla anaerobibakteereita ei juuri-kaan käsitelty. Opinnäytetyön tekoa helpotti se, että bakteriologian harjoittelu sijoittui molemmilla juuri ennen toteutuksen aloitusta. Tämän johdosta bakteriologian osaston käytännöt ja herkkyysmääritysten teko oli tuttua ja hyvin mielessä. Opinnäytetyön suorittamista helpotti myös se, että harjoittelu suoritettiin samassa paikassa kuin tutkimus, joten jo harjoittelun aikana pystyimme valmistautumaan siihen. Harjoittelun ohjaaja tiesi tulevasta työstämme ja järjesti aikataulun sekä ohjelman niin, että normaalikaavasta poiketen pääsimme tutustumaan syvällisemmin anaerobibakteerien diagnostiikkaan. Kokemuksemme tieteellisten tutkimuksen teosta ja tekstien kirjoittamisesta oli melko vähäistä, mutta saimme hyvin tukea ohjaavalta opettajaltamme ja aloitimme kirjoittamisen jo opinnäytetyön aiheen saatuaamme, joten taitomme hioutuivat koko prosessin ajan. Opinnäytetyön aikana opimme paljon tieteellisen tekstin rakenteesta ja vaatimuksista, mutta myös tieteellisen tutkimuksen suorittamisesta.

Lähteet

ATCC 2014: ATCC-organisaatio. Verkkosivu.

<http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Quality_Control_Strains.aspx>. Luettu 23.9.2015.

Biomerieux 2015: E-testi. Verkkodokumentti. Biomerieux Inc.

<<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest>>. Luettu 23.9.2015.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. Verkkosivu. <<http://www.eucast.org>>. Luettu 27.10.2015.

EUCAST 2015. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Verkkodokumentti. <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Slide_show_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf>. Luettu 27.10.2015.

Evira 2013. Clostridium perfringens. Verkkodokumentti. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira.

<<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruoka+myrkytykset/ruokamyrkytyksia+aiheuttavia+bakteereja/clostridium+perfringens/>>. Luettu 24.9.2015.

Roe, D. E. – Finegold, S. M. – Citron, D. M. – Goldstein, E. J. C. – Wexler, H. M. – Rosenblatt, J. E. – Cox, M. E. – Jenkins, S. G. – Hecht, D. W. 2002. Multilaboratory Comparison of Anaerobe Susceptibility Results Using 3 Different Agar Media. *Clinical Infectious Diseases* 35 (Supplement 1). Infectious Diseases Society of America. Oxford Journals. Luettu sähköisessä muodossa osoitteessa:

<http://cid.oxfordjournals.org/content/35/Supplement_1/S40.full.pdf+html>.

Luettu 27.10.2015.

Hilla, Risto 2015a: Laboratoriohoitaja, TtM, kliininen asiantuntija. HUSLAB, kliinisen mikrobiologian vastuualue, bakteriologian osasto. Helsinki. Sähköpostiviesti Jenni Koskiselle. 23.9.2015.

Hilla, Risto 2015b: Laboratoriohoitaja, TtM, kliininen asiantuntija. HUSLAB, kliinisen mikrobiologian vastuualue, bakteriologian osasto. Helsinki. Suullinen tiedonanto Jenni Koskiselle ja Maija Makkoselle. 22.9.2015.

Hoffman, Stuart (toim.) 2002. *Anarobic Bacteriology Manual*. Star Publishing Company: California. 1.

Jousimies-Somer, Hannele – Ristola, Matti 2003a: *Clostridium*-lajit. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.) 2003. *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 228–236.

Jousimies-Somer, Hannele – Vuento, Risto 2003b: *Bakteroides fragilis* ja muita anaerobisia gramnegatiivisia bakteereja. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.) 2003. *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 241–246.

Metropolia 2014. Verkkodokumentti. Tutkimusetiikka. Tutkimuksen eettinen ennakkoarviointi. Metropolia AMK: Helsinki.

<<http://www.metropolia.fi/tutkimus-ja-kehitys/tutkimuksen-eettinen-ennakkoarviointi/>>. Luettu 27.10.2015.

Meurman, Jukka H. – Richardson, Riina – Kinnunen, Ilpo 2011. *Hammassairaudet ja suun bakteeri-infektiot*. Infektiosairaudet. Duodecim. Luettu verkkokirjana. <http://www.oppiportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355>. Luettu 24.9.2015.

Montonen, Leone – Salkinoja-Salonen, Mirja 2001: Anaerobien ja happea rajoitetusti sietävien mikrobien viljeleminen. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.) 2001. *Mikrobiologian perusteita*. Helsingin yliopisto. 66–74.

Nagy, Elisabeth – Stenz Justesen, Ulrik – Eitel, Zsuzsa – Urbán, Edit (on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infection) 2014: Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Cacteroides fragilis* group isolates. Teoksessa Nagy, Elisabeth – Schuetz, Audrey (toim.) 2015. *Anaerobe* 31. Elsevier. US. 65–71.

Rautio, Merja – Vuento, Risto 2010. Bacteroides fragilis -ryhmä. Mikrobiologia. Duodecim. Luettu verkkokirjana.

<http://www.oppiporssi.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355>.

Luettu 24.9.2015.

Rautio, Merja 2010. Anaerobiset grampositiiviset sauvat. Mikrobiologia. Duodecim. Luettu verkkokirjana.

<http://www.oppiporssi.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355>.

Luettu 24.9.2015.

Solunetti 2006. Solubiologia, happipitoisuus. Verkkodokumentti. Suomen virtuaaliyliopisto. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/happipitoisuus_1/3/>. Luettu

24.9.2015.

Tarkka, Eveliina 2015a: Mikrobiologi. HUSLAB, kliinisen mikrobiologian vastuualue, bakteriologian osasto. Helsinki. Suullinen tiedonanto Jenni Koskiselle ja Maija Makkoselle. 22.9.2015.

Tarkka, Eveliina 2015b: Mikrobiologi. HUSLAB, kliinisen mikrobiologian vastuualue, bakteriologian osasto. Helsinki. Sähköpostiviesti Jenni Koskiselle ja Maija Makkoselle. 29.10.2015.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997a. Penisilliinit. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 354–357.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997b. Nitroimidatsolit. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 386–387.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997c. Klindamysiini. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 374–375.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997d. Tetrasykliinit. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 375–376.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997e. Muita beetalaktaameja. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 368–369.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997f. Ampisilliiniryhmän ja beetalaktamaasi-inhibiittoreiden kombinaatiot. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 359–360.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1997g. Bakteerien lääkeherkkyyden määrittäminen. Yleistä bakteerilääkkeistä. Teoksessa: Tiilikainen, Anja – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.) 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. Duodecim: Helsinki. 349–350.